

Aus dem
Institut für Immunologie
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

angefertigt im

Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie (IZI) Leipzig

**Einfluss CD4⁺CD25⁺ regulatorischer T-Zellen auf die hämatopoetische Rekonstitution
nach syngener und allogener Stammzelltransplantation in einem dreifach transgenen
Mausmodell**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Katherina Rothe
aus Leverkusen

Leipzig, 2011

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Uwe Truyen

Betreuer: Prof. Dr. Gottfried Alber

Gutachter: Prof. Dr. Gottfried Alber, Institut für Immunologie der
Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, Leipzig

Prof. Dr. Birgit Sawitzki, Institut für Medizinische Immunologie,
Charité, Berlin

Tag der Verteidigung: 5. April 2011

Meinen Eltern und Julia

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungen	VI
1	Einleitung	1
2	Literaturübersicht	2
2.1	Immunsystem	2
2.1.1	Unspezifische und spezifische Abwehr	2
2.1.2	Immuntoleranz	2
2.2	Regulatorische T-Zellen	3
2.2.1	Phänotyp	3
2.2.2	Subtypen regulatorischer T-Zellen	5
2.2.2.1	Natürliche regulatorische T-Zellen (nT _{regs})	5
2.2.2.2	Induzierte regulatorische T-Zellen (iT _{regs})	5
2.2.3	Funktion	6
2.3	Transplantation	8
2.3.1	Arten der Transplantation	8
2.3.2	Transplantation und Abstoßungsreaktion	9
2.3.2.1	Stammzell-/ Knochenmarktransplantation	9
2.3.2.2	Graft versus Host Disease (GvHD)	9
2.3.2.3	Organtransplantation	10
2.3.2.4	Abstoßungsreaktion	11
2.3.3	Transplantation in der Veterinärmedizin	11
2.3.3.1	Nierentransplantation bei der Katze	12
2.3.3.2	Stammzelltransplantation beim Hund	12
2.4	Immunsuppression und Konditionierung	12
2.5	Stammzelltransplantationsmodelle	13
2.5.1	Mausstämme und ihre Immunantwort	14
2.6	Stammzelltransplantationsmodell mit dreifach transgenen Mäusen	14

3	Tiere, Material und Methoden	15
3.1	Tiere	15
3.1.1	Empfängertiere	15
3.1.2	Spendertiere	15
3.2	Material	15
3.2.1	Geräte	15
3.2.2	Chemikalien	16
3.2.3	Kits, Medien und Reagenzien	17
3.2.4	Antikörper	18
3.2.5	Lösungen und Puffer	18
3.2.6	Verbrauchsmaterialien	19
3.3	Methoden	20
3.3.1	Zellkultur muriner Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	20
3.3.2	Magnetic Activated Cell Sorting (MACS-Separation)	20
3.3.3	Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen	21
3.3.4	Enzyme Linked Immuno Spot Technique (ELISpot)	21
3.3.5	Transplantationsexperimente	22
3.3.5.1	Experimenteller Aufbau	22
3.3.5.2	Übersicht über die Transplantationsexperimente	23
3.3.5.3	Gewicht, klinisches Scoring	25
3.3.5.4	Blutabnahme, Blutparameter	25
3.3.5.5	Chimärismusanalysen mittels Durchflusszytometrie	25
3.3.5.6	Histologie	26
3.3.6	Statistik	27
4	Ergebnisse	28
4.1	Humane CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	28
4.1.1	Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	28
4.1.2	Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression humaner separierter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	29

4.1.3	Zytokinproduktion von Buffy Coat-Zellen und humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	29
4.2	Murine CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	31
4.2.1	Gewinnung muriner Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	31
4.2.2	Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression muriner separierter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	32
4.2.3	Interleukin-2-Produktion von Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	33
4.3	Zellkultur muriner Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	34
4.3.1.	Wachstumsverhalten muriner CD4⁺CD25⁺ T-Zellen <i>in vitro</i>	36
4.3.2	Phänotypische Veränderungen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen in der Zellkultur	36
4.4.	Knochenmark und T_{regs}-Kotransplantation nach Bestrahlung im dreifach transgenen Mausmodell	37
4.4.1	Syngene Transplantation von Knochenmark und T_{regs}-Kotransplantation in dreifach transgene Empfängertiere	37
4.4.1.1	Überleben dreifach transgener Mäuse nach syngener Transplantation von Knochenmark mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation	37
4.4.1.2	Gewichtsverlauf nach syngener Transplantation	38
4.4.1.3	Leukozytenzahl im Blut (WBC) und Differentialblutbild nach syngener Transplantation	39
4.4.1.4	Chimärismusanalysen nach syngener Transplantation - Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen	40
4.4.1.4.1	Humanes CD4⁺ und HLA-DR⁺ auf Empfängerzellen nach syngener Transplantation	40
4.4.1.4.2	Murines H2D^b-MHC nach syngener Transplantation	42
4.4.1.4.3	Murine CD3⁺CD4⁺ T-Helferzellen nach syngener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen	43
4.4.1.4.4	Murine CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nach syngener Transplantation	45
4.4.1.4.5	CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Spender-T_{regs}) und CD3⁺CD4⁻CD25⁺FoxP3⁺ (Empfänger-T_{regs}) T-Zellen nach syngener Transplantation	46
4.4.1.5	Histologie des Knochenmarks nach syngener Transplantation	47

4.4.2	Allogene Transplantation von Knochenmarkzellen, Milzzellen und T_{regs}-Kotransplantation in dreifach transgene Empfängertiere	49
4.4.2.1	Überleben dreifach transgener Mäuse nach allogener Transplantation von Knochenmark- und Milzzellen mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation	49
4.4.2.2	Gewichtsverlauf nach allogener Transplantation	51
4.4.2.3	Leukozytenzahl im Blut (WBC) und Differentialblutbild nach allogener Transplantation	52
4.4.2.4	Chimärismusanalysen nach allogener Transplantation - Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen	55
4.4.2.4.1	Humanes CD4⁺ und HLA-DR⁺ auf Empfängerzellen nach allogener Transplantation	55
4.4.2.4.2	Murines H2K^d-MHC nach allogener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen	58
4.4.2.4.3	Murine CD3⁺CD4⁺T-Helferzellen nach allogener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen	59
4.4.2.4.4	Murine CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nach allogener Transplantation	61
4.4.2.4.5	CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Spender-T_{regs}) und CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ (Empfänger-T_{regs}) T-Zellen nach allogener Transplantation	63
4.4.2.5	Histologie des Knochenmarks nach allogener Transplantation	65
5	Diskussion	66
5.1	Gewinnung und Charakterisierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	66
5.2	Zellkultur muriner CD4⁺CD25⁺ T-Zellen	68
5.3	Syngenes Transplantationsexperiment	70
5.4	Allogene Transplantationsexperimente	73
6	Zusammenfassung	79
7	Summary	81

8	Literaturverzeichnis	83
9	Danksagung	96

Abkürzungen

7AAD	7-Aminoactinomycin D
Abb.	Abbildung
ALP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Apc	Allophycocyanin
APECED	Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy
BC	Buffy Coat
CD	Cluster of Differentiation
CTLA-4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
DRST	Deutsches Register für Stammzelltransplantationen
DSO	Deutsche Stiftung Organtransplantation
ELISpot	Enzyme Linked Immuno Spot Technique
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Fc	Fragment crystalline
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FCS	Fetal Calf Serum
FoxP3	Forkhead-Box-Protein 3
FSC	Forward Scatter
GITR	Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor Receptor
GvHD	Graft versus Host Disease
GvT	Graft versus Tumor
HLA-DR	Histocompatibility Locus A DR
HSZT	Hämatopoetische Stammzelltransplantation
IL-2, 4, 10	Interleukin-2, 4, 10
INF- γ	Interferon γ
KAO	Kernechtrot-Anilinblau-Orange
KM	Knochenmark
LAG3	Lymphocyte Activation Gene 3
MACS	Magnetic Activated Cell Sorting
MHC-II	Major Histocompatibility Complex Typ II
MHC H2D ^b	Major Histocompatibility Complex C57Bl/6

Abkürzungen

MHC H2K ^d	Major Histocompatibility Complex Balb/c
M _{regs}	Regulatorische Makrophagen
mTECs	medulläre Thymusepithelzellen
MZ	Milzzellen
NaCl	Natriumchlorid
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin Cyanin 7
pGAg	periphere Gewebeantigene
PHA	Phytohämagglutinin
Tab.	Tabelle
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TTG	Triple Transgenic
T _{regs}	Regulatorische T-Zellen
TX-Exp	Transplantationsexperiment
WBC	White Blood Cells

1 Einleitung

Hämatopoetische Stammzelltransplantationen (HSZT) sind bei einer Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen heutzutage die einzige Therapiemöglichkeit. Trotz großer Fortschritte in der Transplantationsmedizin in den letzten Jahrzehnten sind solche Eingriffe immer noch mit vielen Komplikationen verbunden. Die häufigste unerwünschte Reaktion nach HSZT ist die Graft versus Host Disease (GvHD). In den durch Chemotherapie oder Bestrahlung immununterdrückten (konditionierten) Empfängerorganismus gelangen durch die Transplantation körperfremde Immunzellen eines Spenders (Knochenmarkzellen, periphere Blutstammzellen, Nabelschnurblutzellen), die Organe und Gewebe des Empfängers erkennen. Um schwere Gewebeschäden (insbesondere an Haut, Leber und Darm) zu vermeiden, wird derzeit die GvHD mit immunsuppressiven Medikamenten therapiert. Die generelle Immunsuppression hat jedoch den großen Nachteil, dass der Organismus von Infektionen, Nebenwirkungen, Organschäden und Tumorentstehung bedroht ist. Es besteht also ein großer Bedarf an alternativen Therapien oder Strategien, das Auftreten einer GvHD nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation zu reduzieren, sowie die Leukopeniedauer so kurz wie möglich zu halten.

Regulatorische T-Zellen (T_{regs}), früher als Suppressorzellen bezeichnet, spielen eine wichtige Rolle bei der Vermeidung überschießender Immunreaktionen und sind daher ein potentieller Kandidat für die Prävention bzw. Therapie von GvHD nach HSZT. T_{regs} stellen eine kleine Zellpopulation dar (1-5% der peripheren Blutzellen) und sind, wie schon der Name sagt, wesentlich für die Hemmung von Immunreaktionen verantwortlich. Einige Forschungsgruppen haben in unterschiedlichen Modellen gezeigt, dass T_{regs} sowohl das Überleben nach Transplantation verbessern, als auch das Vorkommen von GvHD mindern können. Dabei sind die genauen Funktionsmechanismen der Zellen noch nicht vollständig geklärt.

Ziel dieser Arbeit war es, regulatorische T-Zellen durch magnetische Zellseparation aufzureinigen, phänotypisch mittels Durchflusszytometrie zu charakterisieren und ihren Einfluss auf die Rekonstitution der Hämatopoese nach syngener und allogener hämatopoetischer Stammzelltransplantation in einem dreifach transgenen Mausmodell zu untersuchen. Hierfür wurden Überleben und Gewicht der Tiere täglich ermittelt, Blutbild und durchflusszytometrische Chimärismusanalysen wöchentlich erstellt, sowie zum Experimentende histologische Schnitte der Knochen angefertigt.

2 Literaturübersicht

2.1 Immunsystem

2.1.1 Unspezifische und spezifische Abwehr

Die Aufgabe des Immunsystems ist es, den Organismus vor Fremdartigen wie z.B. Mikroorganismen (Bakterien, Viren, Pilze) oder Umweltantigenen (Staub, Pollen, Gräser) zu schützen und diese mittels Immunreaktionen zu bekämpfen und zu eliminieren.

Hierfür gibt es sowohl unspezifische (angeborene) als auch spezifische (erworbene) Abwehrmechanismen (CLARK und KUPPER 2005; KABELITZ 2010; IWASAKI und MEDZHITOV 2010).

Die angeborene Immunität sorgt für eine schnelle Beseitigung bestimmter Antigene mit Hilfe von myeloiden Zellen (Granulozyten, Monozyten/ Makrophagen, NK-Zellen) und humoralen Faktoren wie Zytokinen, Defensinen und dem Komplementsystem (JANEWAY und MEDZHITOV 2002; ARANCIBIA et al. 2007; SEMPLE und FREEDMAN 2010).

Die spezifische Abwehr ist ein komplexes System aus Zellen (B-Zellen, T-Zellen, antigenpräsentierende Zellen) und löslichen Faktoren (Immunglobuline, Zytokine, Chemokine), die miteinander agieren und erst nach Adaptation gezielt das Antigen beseitigen (BONILLA und OETTGEN 2010). Bei wiederholtem Kontakt mit demselben Antigen werden sog. Gedächtniszellen aktiv, durch die eine schnellere Reaktion möglich ist (FARBER 2005).

2.1.2 Immuntoleranz

Damit es zu keiner Reaktion gegen körpereigene Antigene kommt, benötigt der Organismus die Fähigkeit, körpereigene von körperfremden Antigenen zu unterscheiden.

Als Immuntoleranz wird diese Eigenschaft des Immunsystems bezeichnet, zwischen für den Körper gefährlichen und harmlosen Stoffen zu differenzieren und nur auf erstere zu reagieren (SIOUD 2009). Man spricht von Toleranz gegen körpereigene Strukturen. Die Immuntoleranz wird auf zentralem und peripherem Wege erreicht.

Die zentrale Toleranz entsteht während der T-Zellreifung im Thymus (HOGQUIST et al. 2005; KLEIN et al. 2009). Hierbei durchlaufen die T-Zellen ($CD4^+$, $CD8^+$) zunächst im Cortex des Thymus die sog. positive Selektion. Die Zellen, die mit ihrem $CD4$ bzw. $CD8$ die vom Thymusepithel exprimierten MHC-Moleküle erkennen (d.h. eine Bindung eingehen), gelangen weiter in Richtung Mark. Zellen, die nicht oder zu stark am MHC-Molekül binden, gehen in Apoptose (COOK et al. 2007).

An der Markgrenze findet an dendritischen Zellen die sog. negative Selektion statt: Bindet hier der T-Zell-Rezeptor, geht die Zelle zu Grunde, da sie sich gegen körpereigene Strukturen

richtet. Diese zwei Selektionsprozesse überleben nur etwa 5% aller reifenden T-Zellen (JANEWAY 1999).

Medulläre Thymusepithelzellen (mTECs) präsentieren sog. periphere Gewebsantigene (pGAg), damit die reifenden T-Zellen mit einer Vielzahl von Antigenen in Kontakt kommen, die sonst nur außerhalb des Thymus vorkommen. (GARDNER et al. 2009, MATSUMOTO 2009). Hierfür verantwortlich ist der Autoimmun-Regulator (AIRE), der für die ektopische Expression von Antigenen spezialisierter und ausgereifter Zellen oder Organe (wie z.B. Proteinen aus Nervenzellen) auf medullären Thymusepithelzellen sorgt (MATHIS und BENOIST 2007). Wird das AIRE-Gen nicht exprimiert (z.B. infolge einer Mutation), kommt es infolge der fehlenden Präsentation peripherer körpereigener Antigene im Thymus zu Autoimmunität. Die Bedeutung von AIRE wurde anhand der Autoimmunerkrankung APECED (Autoimmune Polyendocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy) erforscht, bei der rezessiv vererbte Mutationen im AIRE-Gen zum Fehlen des AIRE-Proteins und somit zu keiner Präsentation peripherer Gewebean Antigene im Thymus kommt (SUZUKI et al. 2008, CHENG 2007).

Die periphere Toleranz wird benötigt, da nicht alle körpereigenen Peptide im Thymus präsentiert werden (ARNOLD et al. 1993; MUELLER 2010). Hauptsächlich drei Mechanismen sorgen dafür, dass auch Antigene, die in der Körperperipherie vorkommen, toleriert werden: Die Anergie der T-Zellen ist der Zustand fehlender Reaktivität (durch fehlende Kostimulation), die Deletion von T-Zellen ist das Absterben durch andauernden Antigenreiz, die Suppression durch regulatorische T-Zellen ist ein noch nicht vollständig geklärter Prozess (REDMOND und SHERMAN 2005; ZAREK et al. 2008). Als gesichert gilt die Existenz $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen, die TGF- β und Interleukin-10 ausschütten und dadurch andere T-Zellen in ihrer Umgebung hemmen (AKDIS 2009).

2.2 Regulatorische T-Zellen

2.2.1 Phänotyp

Schon in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde an regulatorischen T-Zellen geforscht, damals wurden sie als Suppressorzellen bezeichnet (GERSHON et al. 1972). Aufgrund widersprüchlicher bzw. nicht reproduzierbarer Ergebnisse gelangten diese Zellen jedoch in Vergessenheit. Derzeit werden regulatorische T-Lymphozyten wieder intensiv erforscht, da ihnen ein großes therapeutisches Potential zugesprochen wird. Der Einsatz in der Transplantationsmedizin (WALSH et al. 2004; KORCZAK-KOWALSKA et al. 2007;

VELÁSQUEZ-LOPERA et al. 2008) und in der Therapie von Allergien (SMITH et al. 2008) und Autoimmunkrankheiten (MCHUGH et al. 2001) erscheint sehr vielversprechend.

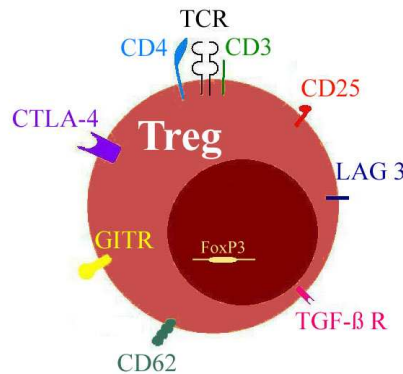


Abbildung 1: Phänotyp regulatorischer T-Zellen (T_{regs}).

Regulatorische T-Zellen exprimieren neben dem T-Zell-Rezeptor (TCR) und den Korezeptormolekülen CD3 und CD4 die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25). Zusätzlich sind auf der Zelloberfläche die Proteine Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4), Glucocorticoid-induced Tumor Necrosis Factor Receptor (GITR), L-Selektin (CD62), Lymphocyte Activation Gene 3 (LAG 3) und der TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) zu finden. Charakteristisch für T_{regs} ist außerdem die hohe intrazelluläre Forkhead-Box-Protein 3- (FoxP3) Expression.

Regulatorische T-Zellen sind eine kleine Subpopulation der Lymphozyten und stellen beim Menschen ca. 5-10% der T-Lymphozyten des peripheren Blutes dar (TAYLOR et al. 2002; TRENADO et al. 2003; SETOGUCHI et al. 2005; HOFFMANN et al. 2005). Wie alle T-Zellen exprimieren sie einen T-Zell-Rezeptor/ CD3 Komplex (MURPHY et al. 2007) (vgl. Abbildung 1).

SAKAGUCHI et al. (1995) beschrieben die Expression von CD25 auf der Zelloberfläche. Dieses Molekül, die α -Kette des Interleukin-2-Rezeptors, wird jedoch auch von anderen Zellen exprimiert (wie z.B. aktivierten T-Effektorzellen) und stellt daher keinen spezifischen Marker für regulatorische T-Zellen dar.

Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wird als weiterer Marker für T_{regs} verwendet (HORI et al. 2003). Bei murinen Zellen ist FoxP3 spezifisch, da er in aktivierten $CD4^+CD25^-$ T-Zellen nicht hochreguliert wird (FONTENOT et al. 2003). Bei humanen Zellen ist FoxP3 kein spezifischer Marker (ZIEGLER 2006). Er ist bei hoher Expression gut geeignet regulatorische T-Zellen zu identifizieren. Allerdings wird das FoxP3-Gen sehr schnell hoch- und herunterreguliert, so dass die FoxP3-Expression wenig stabil ist.

Die intrazelluläre Lokalisation des FoxP3-Transkriptionsfaktors stellt einen Nachteil dar, da der Nachweis erschwert ist und der Marker nicht zur Zellsortierung verwendet werden kann (MULLER et al. 2009).

In den letzten Jahren konnte gezeigt werden, dass eine epigenetische Regulation des FoxP3-Gens wesentlich die Funktion von T_{regs} bestimmt. Der Grad der Methylierung des Gens entscheidet über die suppressiven Eigenschaften der Zellen (BARON et al. 2007; FLOESS et al. 2007).

HOFFMANN et al. (2006) haben aus der $CD45RA^+$ Subpopulation $CD4^+CD25^{\text{high}}$ regulatorische T-Zellen gewonnen und diese Zellen ohne Verlust der FoxP3-Expression *in vitro* expandiert. Bei dieser naiven Subpopulation liegt das FoxP3-Gen in demethyliertem Zustand vor und wird im Laufe des Zellwachstums nicht methyliert.

Weitere phänotypische Merkmale von T_{regs} sind andere mehr oder weniger spezifische Oberflächenmoleküle wie CTLA-4 (READ et al. 2000; TAKAHASHI et al. 2000; WING et al. 2008), CD62L (ERMANN et al. 2005; FENG et al. 2008), GITR (MCHUGH et al. 2002; SHIMIZU et al. 2002), LAG3 (HUANG et al. 2004) und bei humanen T_{regs} CD127 (HARTIGAN-O'CONNOR et al. 2007), die in den unterschiedlichsten Kombinationen zur Charakterisierung von T_{regs} Anwendung finden.

2.2.2 Subtypen regulatorischer T-Zellen

Aufgrund verschiedener Herkunft und Funktionsweisen werden T_{regs} in unterschiedliche Subtypen unterteilt: natürliche (nT_{regs}) und induzierte (iT_{regs}) regulatorische T-Zellen (BLUESTONE und ABBAS 2003; ZHENG et al. 2004).

2.2.2.1 Natürliche regulatorische T-Zellen (nT_{regs})

Als natürliche regulatorische T-Zellen (nT_{regs}) werden die im Thymus selektierten und differenzierten T_{regs} bezeichnet. Der große Vorteil dieser Zellen ist die stabile FoxP3-Expression und die damit verbundene stabile Suppressorfunktion.

Aufgrund des seltenen Vorkommens regulatorischer T-Zellen und ihrer physiologischerweise geringen Proliferationsrate ist es schwierig, genügend Zellen für Versuche bzw. den klinischen Einsatz zu gewinnen (GOLSHAYAN et al. 2007). Daher ist die Suche nach „Herstellungsverfahren“ für T_{regs} bzw. Umwandlung nichtregulatorischer Zellen in T_{regs} von großer Bedeutung (HOFFMANN et al. 2004; TRZONKOWSKI et al. 2008).

2.2.2.2 Induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{regs})

Induzierte regulatorische T-Zellen (iT_{regs}) sind Zellen, die in einem bestimmten Zytokinmilieu zu Zellen mit regulatorischen Eigenschaften differenzieren. *In vivo* entstehen diese Zellen in der Peripherie, zumeist aus $CD4^+$ (KARIM et al. 2002). In der Zellkultur können $CD4^+CD25^-$

T-Zellen durch Zugabe von Interleukin-2 und TGF- β in CD4⁺CD25⁺ Zellen konvertiert werden, bei denen die FoxP3-Expression und damit auch die Suppressorfunktion erhöht sind (HOFFMANN et al. 2004). Dabei sind die CD4⁺CD25⁻ Zellen teilungsfreudiger, auch wenn das TGF- β eine proliferationsinhibierende Wirkung hat. SU et al. (2008) konnten sogar eine bessere Wirkung von iT_{regs} im Vergleich zu nT_{regs} in ihrem Transplantationsmodell zeigen. Innerhalb der iT_{regs} werden 2 Zellklassen unterschieden: T_{r1}- und T_{h3}-Zellen. Sie unterscheiden sich in dem Zytokin, über das sie ihre Wirkung hauptsächlich entfalten. Während T_{r1} Zellen über Interleukin-10 immunoregulatorisch wirken, hemmen T_{h3}-Zellen Immunreaktionen über TGF- β (TRZONKOWSKI et al. 2008).

2.2.3 Funktion

Die Hauptaufgabe von T_{regs} ist es, Immunantworten zu regulieren, eine überschießende Reaktion zu verhindern bzw. für das gänzliche Ausbleiben einer Immunantwort zu sorgen. Es wurde bereits eine Vielzahl möglicher Mechanismen dieser Hemmwirkungen beschrieben (TODA und PICCIRILLO 2006), doch vieles ist auch noch ungeklärt (SHEVACH 2002). Als gesichert gilt, dass es sowohl zellkontaktabhängige als auch zellkontaktunabhängige Mechanismen gibt. Bei *in vitro* Versuchen zeigten DIECKMANN et al. (2001), dass T_{regs} ohne zellulären Kontakt zu Effektorzellen keine Hemmwirkung ausüben.

Regulatorische T-Zellen produzieren im Gegensatz zu anderen CD4⁺ T-Lymphozyten kein Interleukin-2, benötigen es jedoch in großen Mengen zur Proliferation, um ihren anergen Zustand zu überwinden (LE und GEHA 2006). Daher wird auch das proinflammatorische Interleukin-2 zu den hemmenden Mechanismen gezählt, da T_{regs} durch Verbrauch des von Effektorzellen produzierten Interleukin-2 die Proliferation anderer Zellen einschränken (THORNTON und SHEVACH 1998; MALEK et al. 2002) (vgl. Abbildung 2).

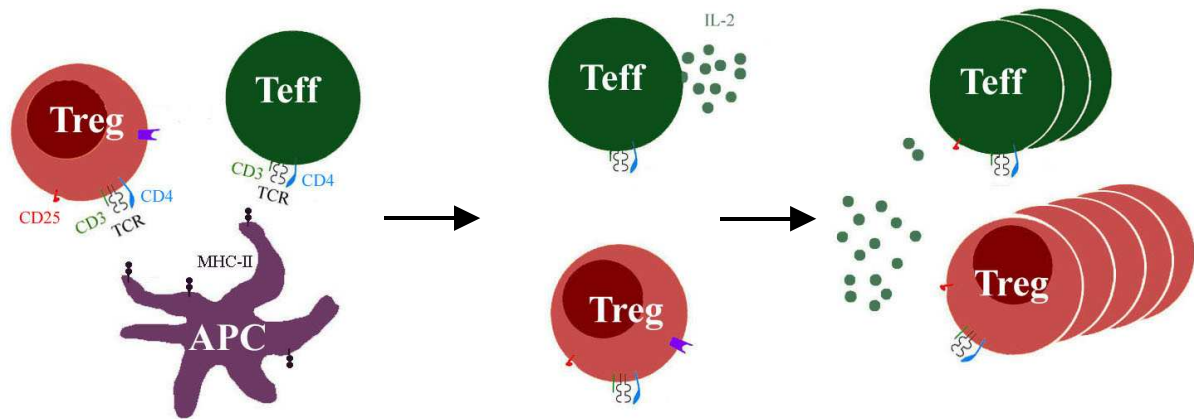


Abbildung 2: Interaktion einer regulatorischen T-Zelle (T_{reg}) und einer T-Effektorzelle (T_{eff}) mit einer antigenpräsentierenden Zelle (APC).

Links Beide T-Zellen (T_{reg} und T_{eff}) binden mit ihrem T-Zell-Rezeptor/ CD3 Komplex (TCR, CD3) und dem CD4-Korezeptormolekül (CD4) am Major Histocompatibility Complex Typ II (MHC-II) der antigenpräsentierenden Zelle (APC). **Mitte** Nur T_{eff}s sezernieren nach Antigenkontakt Interleukin-2 (IL-2). **Rechts** T_{reg}s und T_{eff}s konkurrieren um das freigesetzte Interleukin-2. Aufgrund der höheren Expression der α-Kette des Interleukin-2-Rezeptors (CD25) auf T_{reg}s proliferieren diese in größerem Maße als T_{eff}s.

Das antiinflammatorische Zytokin TGF-β wird nach Bindung des Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) an B7 einer antigenpräsentierenden Zelle ausgeschüttet und führt einerseits zur Erhöhung der FoxP3-Expression (CHEN W et al. 2003), andererseits hemmt es die Lymphozytenaktivierung und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine von Monozyten/ Makrophagen (LEVINGS et al. 2002; WAHL et al. 2002) (vgl. Abbildung 3).

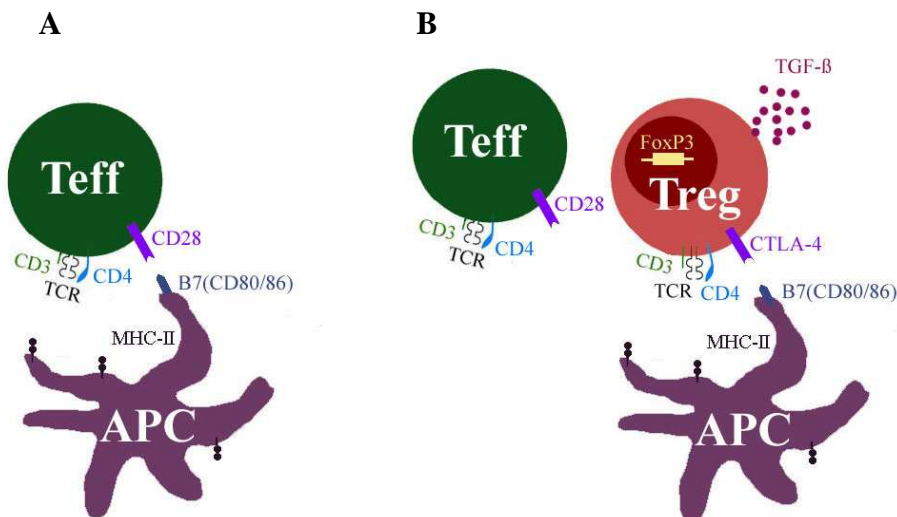


Abbildung 3: Konkurrenz zwischen einer T-Effektorzelle (T_{eff}) und einer regulatorischen T-Zelle (T_{reg}) um die Bindung an eine antigenpräsentierende Zelle.

A Zusätzlich zur Bindung des T-Zell-Rezeptor/ CD3-Komplex (TCR, CD3) und des Korezeptors (CD4) einer T-Effektorzelle (T_{eff}) an den Major Histocompatibility Complex Typ II (MHC-II) der antigenpräsentierenden Zelle (APC) ist als kostimulatorisches Signal für die Aktivierung der T-Zelle die Bindung des CD28-Moleküls einer T_{eff} an das B7-Molekül einer APC nötig. **B** Das Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4 (CTLA-4) auf regulatorischen T-Zellen (T_{reg}s) bindet mit 4-fach höherer Affinität an B7 der antigenpräsentierenden Zelle (APC) und verhindert somit den Kontakt zwischen T_{eff} und APC. Die Interaktion zwischen CTLA-4 und B7 führt zur Erhöhung der Forkhead-Box-Protein 3- (FoxP3) Expression in T_{reg}s und zur Freisetzung des antiinflammatorischen Zytokins TGF-β durch T_{reg}s.

Bei der peripheren Toleranzerhaltung spielen T_{regs} durch ihre supprimierenden Eigenschaften eine wesentliche Rolle (SAKAGUCHI 2004). Aus diesem Grund sind regulatorische T-Zellen in den letzten Jahren in den Interessensfokus vieler Forscher gerückt. Insbesondere in der Transplantationsmedizin (WALSH et al. 2004; KORCZAK-KOWALSKA et al. 2007; VELÁSQUEZ-LOPERA et al. 2008), aber auch bei Autoimmunität (MCHUGH et al. 2001) und Allergien (SMITH et al. 2008) haben T_{regs} große Bedeutung erlangt.

Sowohl bei soliden Organtransplantationen als auch bei Stammzelltransplantationen gibt es vielversprechende Ansätze, die regulatorischen Eigenschaften dieser Zellen auszunutzen und therapeutisch anzuwenden.

2.3 Transplantation

2.3.1 Arten der Transplantation

Bei einer Transplantation werden gezielt körperfremde Strukturen in einen Empfängerorganismus gebracht. In der Regel führt dies zu Abstoßungsreaktionen, die es zu unterdrücken gilt.

Je nach Übereinstimmung der Gewebemerkmale von Spender und Empfänger werden unterschiedliche Transplantationstypen unterschieden (ANASETTI und HANSEN 1992). Bei der autologen Transplantation sind Spender und Empfänger identisch, d.h. dem Patienten werden vor Therapiebeginn oder während der Remission Stammzellen entnommen und nach Konditionierungstherapie (Chemotherapie und/ oder Bestrahlung) wieder appliziert.

Bei der syngenischen Form handelt es sich um die Transplantation zwischen genetisch identischen Individuen (eineiige Zwillinge bzw. zwei Individuen eines Inzuchtstammes im Tierversuch).

Während bei einem allogenen Transplantat Spender und Empfänger der gleichen Spezies zuzuordnen sind, gehören bei einer xenogenen Transplantation Spender und Empfänger nicht der gleichen Art an (z.B. Pankreasinseln des Schweines zur Transplantation beim Menschen).

Die alloplastische Transplantation definiert die Implantation eines künstlichen Materials in einen Empfänger.

Die Akzeptanz eines Transplantats hängt also wesentlich von der Transplantationsform ab. Bei der Art der Abstoßungsreaktion ist zwischen einer soliden Organtransplantation mit Transplantatabstoßung (also einer Empfänger-gegen-Spender-Reaktion) und einer Stammzelltransplantation (bei der Zellen mit immunologischen Funktionen transplantiert

werden) mit Graft versus Host Disease (also Spender-gegen-Empfänger-Reaktion) zu differenzieren.

2.3.2 Transplantation und Abstoßungsreaktion

2.3.2.1 Stammzell- / Knochenmarktransplantation

Stammzell- bzw. Knochenmarktransplantationen sind bei vielen hämatologischen Erkrankungen, insbesondere der Leukämie ein effektives Therapieverfahren (DURAN-STRUUCK und DYSKO 2009). Im Jahr 2008 wurden in Deutschland 2474 allogene Stammzelltransplantationen durchgeführt (DRST 2010).

Trotz der andauernden Zunahme an eingetragenen Knochenmarkspendern in diversen Dateien, existiert nicht für jede nötige Transplantation ein passender Spender. Bei den häufig stattfindenden allogenen Transplantationen kommen viele Komplikationen vor. Neben Infektionen (SAFDAR et al. 2009; TUTHILL et al. 2009) und dem Wiederkehren der Grunderkrankung (DAZZI und FOZZA 2007; KORNACKER et al. 2009) bzw. dem Auftreten von Sekundärtumoren (LAI et al. 2009) ist die Graft versus Host Disease (GvHD), also die Immunreaktion des Spenders gegen den Empfänger, eine gefürchtete Komplikation (REDDY et al. 2009).

2.3.2.2 Graft versus Host Disease (GvHD)

Die transplantierten T-Lymphozyten des Spenders greifen die als „fremd“ erkannten Organe des Empfängers an und zerstören diese aufgrund von Mechanismen, die nachfolgend beschrieben sind. Die GvHD manifestiert sich beim Menschen insbesondere in Leber, Darm, Haut und Auge und führt klinisch zu Ikterus, Kolik und Diarrhoe sowie Entzündungen und Ulzerationen der Haut (FERRARA 2008; HASEGAWA et al. 2008).

Die Schwere der GvHD hängt wesentlich von der Konditionierungstherapie (Bestrahlung/Chemotherapie) und von den Gewebesmerkmalen von Spender und Empfänger ab. Bestrahlung oder Chemotherapie führen im Empfänger zu Gewebeschäden, die mit der Freisetzung von Zytokinen wie IL-1, IL-6 und TNF- α einhergehen. Im entzündeten Gewebe werden vermehrt Major Histocompatibility Complex- (MHC) Antigene und Adhäsionsmoleküle exprimiert und dadurch empfängereigene antigenpräsentierende Zellen (APCs) stimuliert. Der Gewebeschaden im Dünndarm führt außerdem zur Translokation von Endotoxinen (z.B. Lipopolysaccharide), die zusätzlich zur Stimulation von APCs beiträgt. Die antigenpräsentierenden Zellen vom Empfänger exprimieren auf ihrer Zelloberfläche in hohem Maß körpereigene MHC-Antigene, die die transplantierten Spender-T-Zellen aktivieren.

Diese proliferieren und sezernieren proinflammatorische Zytokine (IFN- γ , IL-2). Das durch die Konditionierungstherapie vorgeschädigte Gewebe wird durch differenzierte Spender-T-Effektorzellen, natürliche Killerzellen und zytotoxische T-Zellen zerstört (HILL und FERRARA 2000).

EDINGER et al. (2003) zeigten, dass regulatorische T-Zellen die frühe Expansion alloreaktiver Spender-T-Zellen hemmen und somit die Wahrscheinlichkeit des Vorkommens einer GvHD mindern.

Nach allogener Stammzelltransplantation erleiden bis zu 30% aller Patienten mit HLA identischen Spenderzellen bzw. sogar bis zu 90% aller Empfänger nicht verwandter Spenderzellen eine GvHD (BERGER et al. 2008). Unabhängig vom Spender kommt es bei 20-50% aller transplantierten Personen trotz vorbeugender immunsuppressiver Therapie zu einer GvHD Grad 2 oder schwereren Verlaufsformen (BALL und EGELER 2008).

Um dem Vorkommen einer GvHD vorzubeugen, werden derzeit Immunsuppressiva eingesetzt, die allerdings viele Nebenwirkungen mit sich bringen (LEE und JOACHIM 2008; HO und CUTLER 2008). Auch kommt es beim Einsatz von Immunsuppressiva nach Stammzelltransplantation häufig zum Rezidiv der hämatologisch-onkologischen Grunderkrankung oder zu sekundären, nicht kontrollierbaren Tumoren (WOLFF 2002).

2.3.2.3 Organtransplantation

Die Anzahl an Transplantationen solider Organe hat in Deutschland in den letzten Jahren zugenommen und erreichte 4675 Eingriffe im Jahr 2008 (DSO 2009).

Der Bedarf an Organen steigt stetig an und es existieren lange Wartelisten für ein passendes Transplantat. Vor jeder Transplantation werden die Gewebemerkmale von Spender und Empfänger typisiert und nur bei ausreichender Übereinstimmung wird überhaupt ein Eingriff durchgeführt.

Eine gefürchtete Komplikation nach Transplantation ist die Transplantatabstoßung. Dies wird am Beispiel der Herztransplantation deutlich: Im Jahr 2003 wurden in Deutschland 393 Herzen transplantiert. Die Überlebensrate nach einem Jahr liegt für die transplantierten Patienten bei 70%. Nach fünf Jahren sinkt die Überlebensrate bereits auf 60%. Die chronische Abstoßungsreaktion ist die häufigste Todesursache nach einer Herztransplantation (GLEIBNER 2010).

2.3.2.4 Abstoßungsreaktion

Bei der Abstoßungsreaktion werden die in den Empfängerorganismus gelangten Zellen des Spenderorgans vom Immunsystem des Empfängers als körperfremd erkannt und vernichtet.

Abstoßungsreaktionen werden in hyperakute, akute und chronische Transplantatabstoßung eingeteilt (CORNELL et al. 2008).

Die Abstoßung beinhaltet T-Zell-vermittelte (ALLEN et al. 2008) und Antikörper-vermittelte (UBER et al. 2007) Reaktionen.

Bei ersterer erfassen die T-Helferzellen ($CD4^+$) in der Erkennungsphase die Alloantigene des Spenderorgans. In der anschließenden Proliferation-/ Differenzierungsphase wandern die antigenstimulierten T-Zellen in Milz und Lymphknoten und führen zur Entstehung von T- und B-Effektorzellen. In der Destruktionsphase lysieren T-Effektorzellen ($CD8^+$) körperfremde Zellen und die Antikörper der aus B-Zellen differenzierten Plasmazellen aktivieren nach Antigenbindung das Komplementsystem, wodurch es zu Gewebezerstörung kommt.

Bei der Antikörper-vermittelten Abstoßung werden je nach Zeit des Auftretens nach der Transplantation die hyperakute, die akute und die chronische Abstoßung unterschieden. Sind bereits präexistente Antikörper gegen das Transplantat im Empfänger vorhanden (z.B. bei Empfängern von Spenderblut oder Zweittransplantationen, sowie nach Schwangerschaft), kommt es innerhalb von Minuten bis Stunden zur hyperakuten Abstoßung. Die akute Abstoßung beginnt 12 Tage bis 4 Monate nach Transplantation und beruht auf der Wirkung von B- und T-Zellen mit oben beschriebenen Pathomechanismen. Die chronische Abstoßung (nach Monaten bis 1 Jahr) ist durch Immunkomplex-vermittelte Vaskulopathien bedingt, die zu einer Minderdurchblutung von Organen und transplantierten Geweben führen.

2.3.3 Transplantationen in der Veterinärmedizin

Prinzipiell sind Transplantationen beim Haustier ebenso denkbar und durchführbar wie beim Menschen. Erste Transplantationsversuche wurden an Tieren durchgeführt und auch heute versucht man in zahlreichen Tierversuchen, die als Modelle dienen, Transplantationen praktikabler zu machen bzw. unerwünschte Begleiterscheinungen zu minimieren.

Transplantationen werden in Deutschland in der Kleintiermedizin routinemäßig nicht durchgeführt. In der Bundesrepublik ist gesetzlich „das vollständige oder teilweise Entnehmen oder Zerstören von Organen oder Geweben eines Wirbeltieres“ durch §6 des Tierschutzgesetzes verboten.

In den USA hingegen werden zum Beispiel Nierentransplantationen bei der Katze oder Stammzelltransplantationen beim Hund durchgeführt.

2.3.3.1 Nierentransplantation bei der Katze

Chronische Niereninsuffizienz ist eine häufige Todesursache bei Katzen. Ist durch Infusionstherapie keine Besserung der Nierenwerte zu erzielen, sind die therapeutischen Möglichkeiten schnell ausgeschöpft. An der School of Veterinary Medicine der University of Pennsylvania wird in solchen Fällen eine Nierentransplantation durchgeführt. Bedingung ist dabei, die Adoption des Spendertiers (wenn es sich nicht ohnehin schon um ein Tier aus demselben Haushalt handelt). Prinzipiell ist dieser Eingriff bei Tieren jeden Alters möglich. 90% der Tiere überleben die Intervention und 60% geht es auch nach einem Jahr nach der Operation noch gut. Die Kosten für die Nierentransplantation belaufen sich auf ca. 8000\$ für die Operation und weiteren Folgekosten von 30 - 60\$ im Monat (ANON. 2007).

2.3.3.2 Stammzelltransplantation beim Hund

Das maligne Lymphom ist eine der häufigsten Tumorerkrankungen beim Hund. Mit gängigen Therapiestrategien (insb. Chemotherapie, Madison-Wisconsin-Protokoll) beträgt die durchschnittliche Überlebenszeit 357 Tage, wobei nur 23% über 2 Jahre nach Behandlung noch leben (Tierärztliches Institut für angewandte Kleintiermedizin 2007).

Am Veterinary Teaching Hospital des North Carolina State College of Veterinary Medicine wird ein neues Therapieverfahren angeboten. Mittels Leukapherese werden "gesunde" Stammzellen des Patienten aus dem peripheren Blut gewonnen (nach vorheriger Ausschwemmung aus dem Knochenmark). Anhand von Unterschieden in ihrer Dichte werden gesunde von tumorösen Zellen getrennt. Restliche entartete Stammzellen werden durch Bestrahlung geschädigt und die „gesunden“ Stammzellen anschließend autolog transplantiert. Mit diesem Verfahren berichtet Steven Suter von einer Heilungsrate von 30% (gegenüber max. 2% bei gängiger Therapie) (NC State College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital).

2.4 Immunsuppression und Konditionierung

Bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen wird das Immunsystem des Empfängers vor der Transplantation supprimiert (Konditionierung). Hierfür werden unterschiedliche Bestrahlungs- und Chemotherapieprotokolle verwendet. Damit das transplantierte Organ (Knochenmark, Stammzellen) nach der Konditionierung nicht abgestoßen wird oder sich

gegen das Empfängergewebe richtet, werden derzeit nach der Transplantation zusätzlich immununterdrückende Medikamente eingesetzt.

Diese Medikation ist allerdings von einer Vielzahl unerwünschter Nebenwirkungen begleitet. Durch das unterdrückte Immunsystem steigt für die Patienten das Risiko für Infektionen und Tumorrezidive erheblich an (FUHRER et al. 1998).

Aufgrund der zahlreichen Nebenwirkungen ist die Suche nach Alternativen zur bisherigen konventionellen Immunsuppression dringend erforderlich.

2.5 Stammzelltransplantationsmodelle

In den letzten Jahren haben viele Arbeitsgruppen Transplantationsmodelle etabliert, um den Einfluss regulatorischer T-Zellen auf GvHD nach Stammzelltransplantation zu untersuchen (TAYLOR et al. 2002; JOFFRE et al. 2004; COHEN und SALOMON 2005; NGUYEN et al. 2006; SU et al. 2008).

Da T_{regs} alleine selbst bei hohen Zellkonzentrationen und bei voller Spenderunverträglichkeit nach Transplantation keine GvHD auslösen (HOFFMANN et al. 2006a), setzten viele Forscher diese Zellen in Kotransplantationsversuchen ein.

Als Stammzellquelle dient im Mausmodell meist das Knochenmark aus Femur und Tibia von Spendertieren. Die Transplantation von Knochenmark allein löst im Mausmodell keine GvHD aus (NGUYEN et al. 2006). Das murine Knochenmark enthält nur wenige CD4⁺ T-Zellen, die nach Transplantation eine GvHD verursachen würden (HOFFMANN et al. 2006a). Viele dieser CD4⁺ Zellen haben regulatorische Eigenschaften (ZENG et al. 2002).

Im GvHD-Modell werden also entweder zusätzlich zum Knochenmark T-Zellen transplantiert, die meist aus Milzzellen oder Lymphknoten gewonnen werden (NGUYEN et al. 2006), oder die regulatorischen Zellen werden aus dem Knochenmark depletiert (TAYLOR et al. 2001).

Die Schwere der GvHD hängt im Mausmodell auch wesentlich von der Art der Transplantation ab. Bei syngener Transplantation im Mausmodell erreicht man praktisch keine GvHD durch Kotransplantation von Milzzellen. Viele Gruppen arbeiten mit einem „parent into F1 Modell“. Dabei handelt es sich um ein semiallogenes oder haploidentisches System, d.h. als Spender dient ein Elternteil des Empfängers (TRENADO et al. 2003; STELLJES et al. 2004; PULAIEV et al. 2005).

Bei allogener Transplantation sind schwere Verläufe von GvHD zu beobachten, die nicht selten mit dem Versterben der Tiere einhergehen (HOFFMANN et al. 2002; ERMANN et al. 2005; YANG et al. 2009).

2.5.1 Mausstämme und ihre Immunantwort

Die Mausstämme, die üblicherweise für Tierversuche eingesetzt werden, reagieren zum Teil sehr unterschiedlich auf verschiedenste Manipulationen. Für die in dieser Arbeit verwendeten Mausstämme C57Bl/6 und Balb/c sind differierende Immunantworten beschrieben (MILLS et al. 2000). Diese unterschiedliche Reaktionsweise auf Stimulation des Immunsystems hat Einfluss auf das Ergebnis der Transplantation.

C57Bl/6-Mäuse reagieren nach Antigenkontakt typischerweise mit einer Th1-Antwort. Es werden große Mengen IFN- γ und andere proinflammatorische Zytokine (IL-2; TNF- α) produziert (MOSMANN et al. 1986, HEINZEL et al. 1989). Durch weitere Zytokinausschüttung von antigenpräsentierenden Zellen (insbesondere Makrophagen) schaukelt sich die Immunantwort hoch, die Antigenpräsentation nimmt zu und auch zytotoxische T-Zellen und opsonisierende Antikörper aus B-Zellen sind am Entzündungsgeschehen beteiligt (MURPHY et al. 2007).

Balb/c-Mäuse hingegen reagieren auf Stimulation des Immunsystems mit einer Th2-Antwort (MILLS et al. 2000). Hierbei interagieren CD4⁺ T-Zellen mit B-Zellen, die zur Antikörperproduktion und Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (insbesondere IL-4, IL-5, IL-6 und IL-10) stimuliert werden (FIORENTINO et al. 1989).

2.6 Stammzelltransplantationsmodell mit dreifach transgenen Mäusen

Im Rahmen der Doktorarbeit wurde ein Stammzelltransplantationsmodell entwickelt, in dem als Empfängertiere humanisierte dreifach transgene Mäuse verwendet wurden.

Um die Übertragung von Ergebnissen aus Tierversuchen auf den Menschen zu erleichtern, wurde eine humanisierte Maus für die Versuche verwendet. Diese exprimiert bei Ausschaltung des murinen CD4-Moleküls (μ CD4⁻) das humane CD4- (hu CD4⁺) und zusätzlich ein humanes MHCII-Molekül (HLA-DR⁺) (LAUB et al. 2000). In früheren Versuchen konnten diese Mäuse erfolgreich mit nicht-adhärenenten Knochenmarkzellen transplantiert werden (FRICKE et al. 2009a).

Zum Einfluss von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen auf Graft versus Host Disease und Abstoßung wurde in den letzten Jahren viel geforscht, die Frage nach den Mechanismen, wie T_{regs} einer GvHD vorbeugen sind jedoch noch ungeklärt. Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Effektes von T_{regs} auf die „neue“ (von den Spenderzellen ausgehende) Hämatopoese nach Bestrahlung und Transplantation.

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die im Rahmen des Dissertationsvorhabens durchgeführten Tierversuche besteht nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes Genehmigungspflicht. Die Genehmigung wurde von der Landesdirektion Leipzig (Braustraße 2, 04107 Leipzig) am 4.11.2008 mit dem Aktenzeichen TVV 28/08 erteilt.

3.1.1 Empfängertiere

Als Empfänger wurden humanisierte, dreifach transgene CD4/ DR3-Mäuse (TTG) verwendet. Die Tiere haben einen stabilen genetischen C57Bl/6-Hintergrund, exprimieren jedoch bei Ausschaltung des murinen CD4 (auf beiden Chromosomen) das menschliche CD4 T-Zell-Korezeptormolekül. Die humane CD4-Expression wird durch ein Konstrukt aus murinem CD4-Promotor und humanem CD4-Minigen, das die Exons aller codierenden Regionen enthält, erreicht. Außerdem besitzt die Maus zusätzlich zum murinen, ein humanes MHC-II Gen (DR3), welches auf antigenpräsentierenden Zellen exprimiert wird. Somit ist die komplette akzessorische CD4-T-Zellrezeptor-Synapse mit menschlichen Zell-Oberflächenmolekülen besetzt (LAUB et al 2000).

Die Tiere wurden im Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig gezüchtet und an gleichem Ort während der Versuche unter standardisierten Bedingungen gehalten. Dort sind ebenfalls alle erforderlichen Voraussetzungen für die erfolgreiche Realisierung der tierexperimentellen Arbeiten gegeben.

3.1.2 Spendertiere

Als Spendertiere kamen wildtyp C57Bl/6- (für syngene Transplantationen, Th1-Responder) und Balb/c-Inzuchttiere (für allogene Transplantationen, Th2-Responder) zum Einsatz.

Die Mäuse wurden von Charles River Laboratories und aus dem Medizinisch Experimentellen Zentrum der Universität Leipzig bezogen.

3.2 Material

3.2.1 Geräte

Bestrahlungsgerät D3225 Orthovoltage	Gulmay Medical, Camberley, UK
Blood counter Scilvet	scil animal care company GmbH, Viernheim, D
Extend Waage	Sartorius AG, Göttingen, D

FACSCanto™ II , FACSDiva Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
FACScalibur, CellQuest Pro Software	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Feinwaage LE324S	Sartorius AG, Göttingen, D
HERA safe Sterilbank	Thermo Scientific, MA, USA
Hereaus Multifuge 3SR+	Thermo Scientific, MA, USA
Imager.A1 AXIO Mikroskop	Carl Zeiss AG, Oberkochen, D
Inverses Mikroskop Leica DM IL LED	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
iSpot FluoroSpot Reader Sytem	AID GmbH, Strassberg, D
Kamera, AxioVision Software	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, D
Kamera Mikroskop Leica EC3	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
MACSiMAG Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACSmix Tube Rotator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikrotom SM 2255	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Wetzlar, D
MidiMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MiniMACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Neubauer Zählkammer	Marienfeld GmbH & Co, Lauda-Königshofen, D
Quadro MACS™ Separator	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Zentrifuge Mikro 200R	Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, D

3.2.2 Chemikalien

Anilinblau	VWR, Leuven, B
Aqua dest.	Millipore, Schwalbach/Ts, D
β-Mercaptoethanol	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
Diethylether	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken, D
Eisessig	Merck KgaA, Darmstadt, D
Ethanol	VWR, Leuven, B
Ethylendiamintetraessigsäure	Roth, Karlsruhe, D
HEPES	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
Isopropanol	VWR, Leuven, B
KCl	J.T.Baker, Deventer, NL
Kernechtrubin	VWR, Leuven, B
KH ₂ PO ₄	Roth, Karlsruhe, D
Methylbenzoat	Roth, Karlsruhe, D
NaCl	VWR, Leuven, B

Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	Riedel-deHaen/ Sigma Aldrich, Seelze, D
Orange G	VWR, Leuven, B
SDS/ Natriumlaurylsulfat	Roth, Karlsruhe, D
Wolframphosphorsäure	VWR, Leuven, B
Xylol	VWR, Leuven, B

3.2.3 Kits, Medien und Reagenzien

AB-Serum/ USA	Sigma, Steinheim, D
AIM-V Medium	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
Baytril® 2,5% ad us. vet., orale Lösung	Bayer Animal Health GmbH, Leverkusen, D
BD FACS Lysing solution	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Biocoll	Biochrom AG, Berlin, D
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
CD4 ⁺ CD25 ⁺ Regulatory T Cell Isolation Kit, human	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
ELISpot Kit, IL-2, 4, 10, mouse	Mabtech AB, D
ELISpot Kit, IL-2, 4, 10, IFN-γ, human	Mabtech AB, D
Entellan®	Merck KGaA, Darmstadt, D
FBS South American (CE)	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
FcR Blocking Reagent (human, murin)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Formalin Roti®-Histofix 4 %	CARL ROTH GmbH & Co KG, Karlsruhe, D
Gentamicin	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
Heparin-Natrium-25.000	Ratiopharm, Ulm, D
Kodan® Tinktur Forte	Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, D
Osteosoft®	Merck KGaA, Darmstadt, D
Oxytetracyclin Augensalbe	Jenapharm, Jena, D
Paraffin Histosec®	Merck KGaA, Darmstadt, D
Phytohämagglutinin	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
Reagenzpack scil vet ABC	scil animal care company GmbH, Viernheim, D
Recombinant Murine IL-2	PeproTech GmbH, Hamburg, D
RPMI Medium 1640	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK
T Cell Activation/ Expansion Kit, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

Tissue-Tek® O.C.T™ Compound	Sakura, AT Zoeterwoude, NL
T _{reg} -Detection Kit, mouse	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Trypanblau 0,4%	Invitrogen/ Gibco, Paisley, UK

3.2.4 Antikörper

Anti-Maus CD3 FITC	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ratte IgG2b FITC, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Maus CD4 FITC	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Anti-Maus CD4 PC7	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Ratte IgG2a PC7, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Human CD4 Apc	Beckman Coulter, Krefeld, D
Anti-Human CD4 FITC	Immunotools, Friesoythe, D
Maus IgG1 FITC, Isotyp	Immunotools, Friesoythe, D
Anti-Maus CD8 Apc	Beckman Coulter, Krefeld, D
Ratte IgG2a,κ Apc, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Maus CD8a (Ly-2) PerCP	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Ratte IgG2a,κ PerCP, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Maus CD25 PE	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Ratte IgM PE, Isotyp	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human CD25 PC5	Beckman Coulter, Krefeld, D
Maus IgG2a PC5, Isotyp	BioLegend, San Diego, CA, USA
Anti-Human/ Maus FoxP3 Apc	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Maus IgG1 Apc, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Maus H2D ^b PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Maus H2K ^d PE	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Maus IgG2a,κ PE, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Anti-Human HLA-DR FITC	Immunotools, Friesoythe, D
Maus IgG3κ FITC, Isotyp	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D

3.2.5 Lösungen und Puffer

Kernechtrotlösung	0,1 g Kernechtrubin in 100 ml Aqua dest. 1 ml Eisessig
Anilinblau-Orange nach HALMI-KONCNY	0,1 g Anilinblau 0,3 g Orange G

	0,5 g Phosphorsäurewolframat	
	1 ml Eisessig	
	Ad 100 ml Aqua dest.	
	Kochen, Abkühlen, Filtrieren	
MACS-Puffer	PBS	pH7,2
	0,5% FCS	
	2 mM EDTA	
PBS (10x)	80 g NaCl	pH 7,4
	2 g KCl	
	11,5 g Na ₂ HPO ₄ x 2H ₂ O	
	2 g KH ₂ PO ₄	
	Ad 1000 ml H ₂ O.	

3.2.6 Verbrauchsmaterialien

BD Falcon™ Zellsiebe	VWR, Leuven, B
CELLSTAR® 24 Well Zellkultur Multiwell Platten	Greiner Biochemica, Fracht, D
Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG, Braunschweig, D
Einbettkassetten	Medim Uni Safe, MDS-Group, Buseck, D
Eppendorf-Reaktionsgefäß	Eppendorff, Hamburg, D
Falcon™ Rundboden-Röhrchen	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, D
Filterpapier Whatman	Whatman GmbH, Dassel, D
Hämatokrit-Kapillaren	Greiner Biochemica, Fracht, D
MACS® Columns (LD, LS, MS)	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Metall-Einbettförmchen	Bio-Optica, Mailand, I
Multiwellplatten für ELISpot	Millipore, Schwalbach/ Ts., D
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Polysine Objektträger	VWR, Leuven, B
Spritzen Terumo Syringe	VWR, Leuven, B
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D

3.3 Methoden

3.3.1 Zellkultur muriner Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Für die Gewinnung von Milzzellen wurden C57Bl/6- und Balb/c-Wildtypmäuse verwendet. Die Milzen der Tiere wurden durch ein Zellsieb (100µm) gedrückt und zweimal mit MACS-Puffer gewaschen (350 g, 10 Minuten). Die Zellzahl der Einzelzellsuspension wurde anschließend in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblau-Färbung bestimmt.

Die CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden wie unter 3.3.2 beschrieben separiert und wie unter 3.3.3 erläutert durchflusszytometrisch charakterisiert.

Die frisch gewonnenen Milzzellen bzw. frisch separierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden auf einer Zellkulturplatte ausgesetzt. Pro Vertiefung wurden 2x10⁶ Milz- bzw. CD4⁺CD25⁺ T-Zellen eingesetzt. Zusätzlich wurden in jedes Well 4x10⁶ Stimulatorbeads (MACSiBeads) und 2000 U/ml murines rekombinantes Interleukin-2 gegeben. Die Beads wurden nach Herstellerprotokoll mit Anti-CD3- und Anti-CD28-Antikörpern beladen. Die Zellen wurden über einen Kultivierungszeitraum von einer Woche täglich begutachtet, fotografiert und bei Bedarf gesplittet bzw. mit neuem Medium versorgt. An Tag 7 wurden die MACSiBeads mit Hilfe eines Magneten entfernt und die Zellzahlen wurden bestimmt. Anschließend wurden die expandierten Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

3.3.2 Magnetic Activated Cell Sorting (MACS-Separation)

Die wie unter 3.3.1 beschrieben gewonnenen Milzzellen wurden mit dem CD4⁺CD25⁺ T Cell Isolation Kit nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Bei der Magnetic Activated Cell Separation (MACS) wurden aus der Ausgangsfraction (Milzzellen) mit Hilfe eines Antikörpermixes (CD8a, CD11b, CD45R, CD49b, Ter-119) zunächst alle unerwünschten CD4⁻ Zellen herausortiert (Depletion). Dabei binden biotinylierte Antikörper an der Zelloberfläche der zu depletierenden Zellen. Anti-Biotin-Antikörper, die an eisenhaltige Partikel (Beads) gekoppelt sind, binden an die biotinylierten Antikörper. Die so markierten Zellen wurden auf eine Säule in einem Magnetfeld gegeben. Alle CD4⁻ Zellen wurden im Magnetfeld in der Säule festgehalten.

Aus dem Durchlauf wurden in einem zweiten Schritt die CD25⁺ Zellen mit einem Anti-CD25-PE Antikörper markiert (positive Selektion) und über Anti-PE-Beads selektiert. Die erwünschten Zellen (CD4⁺CD25⁺) wurden in der Säule festgehalten und konnten nach Entfernen des Magnetfelds eluiert werden. Für eine bessere Reinheit wurden die eluierten CD4⁺CD25⁺ Zellen über eine zweite Säule gegeben.

Die separierten $CD4^+CD25^+$ Zellen, sowie die Zellen aus den Zwischenschritten (Ausgangszellen (Milzzellen), $CD4^-$ Zellen, $CD4^+CD25^-$ Zellen) wurden im Durchflusszytometer analysiert, um den Erfolg der Separation zu kontrollieren.

Für die Gewinnung humaner regulatorischer T-Zellen wurden aus Buffy Coats (BC) gesunder Spender mittels Biocoll-Gradient-Zentrifugation Leukozyten gewonnen. Dazu wurden Buffy Coats 1:2 mit sterilem PBS verdünnt, davon 20 ml auf 15 ml Biocoll geschichtet und bei 1600 rpm für 30 Minuten zentrifugiert (bei ausgeschalteter Rotorbremse). Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer mittels Trypanblaufärbung bestimmt.

Die MACS-Separation wurde mit dem $CD4^+CD25^+$ T Cell Isolation Kit durchgeführt. Zunächst wurden die $CD4^-$ Zellen der Leukozyten mit einem Antikörpermix aus Anti-CD8, Anti-CD14, Anti-CD16, Anti-CD19, Anti-CD36, Anti-CD56, Anti-CD123, Anti-TCR γ/δ und Anti-CD235a depletiert. Anschließend erfolgte die positive Selektion $CD25^+$ Zellen (vgl. Separation muriner regulatorische T-Zellen).

3.3.3 Durchflusszytometrische Analyse regulatorischer T-Zellen

Die gewonnenen regulatorischen T-Lymphozyten wurden mit Hilfe des T_{reg} Detection Kits analysiert. Die Färbung wurde nach Herstellerprotokoll durchgeführt: nach Fixierung der Oberflächenfärbung (CD4 FITC, CD25 PE) wurden die Zellen permeabilisiert (30 Minuten bei 4°C in Fixation/ Permeabilisation Puffer inkubieren) und intrazellulär FoxP3 (30 Minuten bei 4°C inkubieren) gefärbt. Im Durchflusszytometer wurde der Anteil an $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen ermittelt.

3.3.4 Enzyme Linked Immuno Spot Technique (ELISpot)

Der ELISpot (Enzyme Linked Immuno Spot Technique) dient dem Nachweis von durch eine bestimmte Zellart produzierten Zytokinen. Ein sog. Erfassungsantikörper bindet das aus der Zelle sezernierte Zytokin, ein zweiter, sog. Detektionsantikörper, bindet ein anderes Epitop des nachzuweisenden Zytokins und lässt durch die enzymatische Umsetzung eines Substrates blaue Punkte (Spots) auf einer Membran sichtbar werden. Diese können mit Hilfe eines Auslesegerätes gezählt werden.

Für die Vorbereitung der ELISpot-Platte wurde zunächst der Erfassungsantikörper unter sterilen Bedingungen mit sterilem PBS auf eine Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ eingestellt. Bevor der verdünnte Antikörper auf die Platte gegeben wurde, wurde diese mit 15 μl

35%igem Ethanol pro Vertiefung befeuchtet. Nach einer Minute Inkubation wurde fünfmal mit sterilem Wasser (200 µl/Well) gewaschen. Von der verdünnten Antikörperlösung wurden 100 µl in jede Vertiefung gegeben und die Platte über Nacht bei 4-8°C aufbewahrt.

Nach 24 Stunden wurde die Antikörperlösung entfernt und die Platte fünfmal mit sterilem PBS (200 µl/Well) gewaschen. Anschließend wurden für mindestens 30 Minuten 200 µl/Well des Zellkulturmediums mit Serum (10%ig) auf der Platte bei Raumtemperatur inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blocken. Nach Entfernen des Mediums wurde, ohne zu waschen, die Zellsuspension auf die Platte pipettiert und für 30-40 Stunden im Brutschrank inkubiert.

Die Zellen wurden entfernt und die Vertiefungen fünfmal mit PBS gewaschen. Der Detektionsantikörper wurde in PBS mit 0,5% FCS auf eine Konzentration von 1 µg/ml eingestellt. 100 µl/Well der Antikörperlösung wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit PBS kamen für eine Stunde bei Raumtemperatur 100 µl/Well einer 1:1000 verdünnten Streptavidin-ALP in PBS mit 0,5% FCS-Lösung auf die Platte. Nach Abkippen der Lösung wurde fünfmal mit PBS gewaschen und 100 µl/Well filtrierte Substrat auf die Platte gegeben. Die Entwicklung erfolgte bei Raumtemperatur, im Dunkeln, bis deutliche Spots zu sehen waren (20-40 Minuten). Die Entwicklung wurde durch Waschen mit ausreichend Leitungswasser gestoppt. Die bei Raumtemperatur und im Dunkeln getrocknete Platte wurde am iSpot FluoroSpot Reader ausgezählt.

3.3.5 Transplantationsexperimente

3.3.5.1 Experimenteller Aufbau

Aus wildtyp C57Bl/6- (für syngene Transplantation) bzw. Balb/c- (für allogene Transplantation) Mäusen wurden die Zellen für die Transplantationsexperimente gewonnen. Aus Femur und Tibia wurde das Knochenmark herausgespült und nach zweimaligem Waschen auf die gewünschte Zellzahl eingestellt. Aus den Milzen wurden, wie unter 3.3.1 beschrieben, Einzelzellsuspensionen hergestellt, die für die Transplantation bzw. für die Separation von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verwendet (vgl. Abbildung 4).

Die Transplantation erfolgte in dreifach transgene Empfängermäuse (TTG). Diese wurden 4-8 Stunden vor dem Eingriff bestrahlt (0,4 Gy/g Körpergewicht). Unter kurzer Ethernarkose wurden die Tiere intravenös in die laterale Schwanzvene transplantiert. Für die Verwendung von Ether bei den Versuchstieren lag eine Ausnahmegenehmigung der Landesdirektion Leipzig (Aktenzeichen 24-9168.40) vor.

Für den Zeitraum von 2 Wochen, beginnend 2 Tage vor der Transplantation, standen die Tiere unter antibiotischem Schutz. Es wurden 1,5 ml pro 250ml Trinkwasser Baytril® 2,5% (orale Lösung) appliziert (entspricht ca. 0,02-0,05 mg/g Körpergewicht).

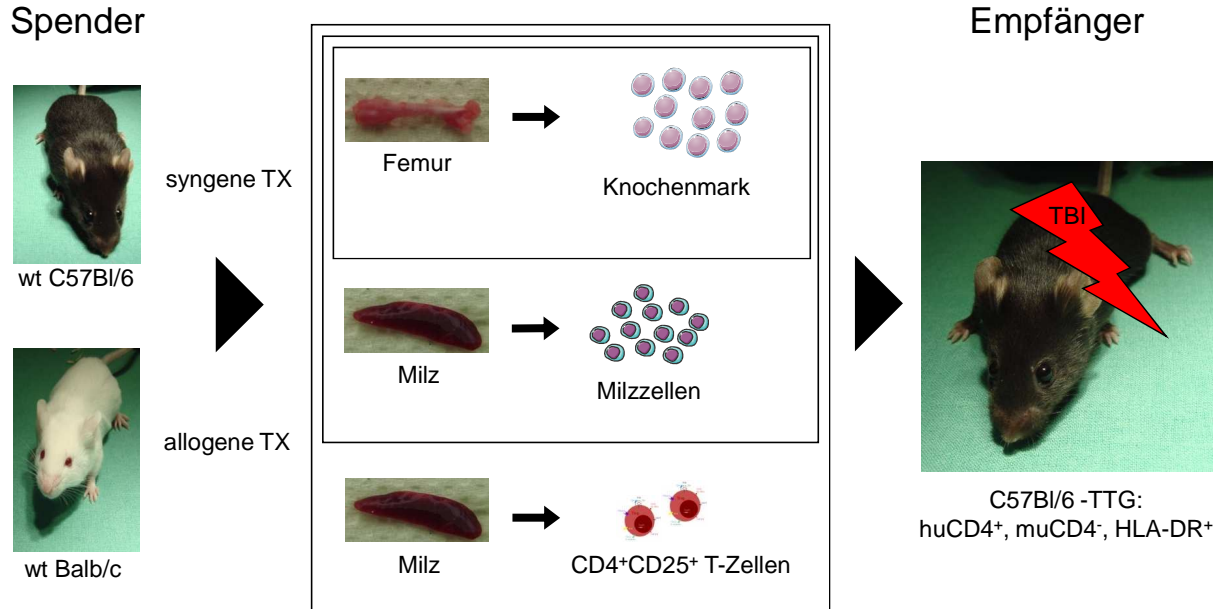


Abbildung 4: Experimenteller Aufbau der Transplantationsexperimente.

Links Als Spendertiere wurden für die syngene Transplantation wildtyp (wt) C57Bl/6- und für die allogene wildtyp (wt) Balb/c-Tiere verwendet. **Mitte** Aus Femur und Tibia der Spendertiere wurde Knochenmark ausgespült, Milzzellen wurden durch ein Sieb vereinzelt und ein Teil der Milzzellen für die magnetische Separation von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen verwendet. Die Spenderzellen wurden je nach Experiment in unterschiedlichen Zellzahlen und Zusammensetzungen transplantiert (vgl. Tabelle 1). **Rechts** Als Empfänger dienten durch Ganzkörperbestrahlung (total body irradiation, TBI) konditionierte dreifach transgene Mäuse mit genetischem Hintergrund einer C57Bl/6-Maus (C57Bl/6-TTG). Diese exprimieren humanes CD4 (huCD4⁺) auf Lymphozyten und humanes MHC (HLA-DR⁺) auf antigenpräsentierenden Zellen bei Ausschaltung des murinen CD4-Moleküls (muCD4⁻).

3.3.5.2 Übersicht über die Transplantationsexperimente

Im ersten Transplantationsexperiment (TX-Exp 1) wurden syngen (Spender: wildtyp C57Bl/6) Knochenmarkzellen (KM) und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{regs}) verabreicht: Die Versuchsgruppe erhielt 2x10⁶ KM und 1x10⁶ T_{regs}, die Kontrollgruppe 2x10⁶ KM. Als Kontrolle für die Konditionierung (Bestrahlungskontrolle) wurde eine Gruppe bestrahlt und nur mit 0,9%iger Natriumchloridlösung (NaCl) behandelt (vgl. Tabelle 1).

Im zweiten Transplantationsexperiment (TX-Exp 2) wurde das TX-Exp 1 auf das allogene Modell (Spender: wildtyp Balb/c) übertragen: Die Versuchsgruppe bekam 2x10⁶ KM und 1x10⁶ T_{regs} transplantiert, die Kontrollgruppe 2x10⁶ KM. Eine Bestrahlungskontrollgruppe (NaCl) wurde mitgeführt (vgl. Tabelle 1).

In zwei weiteren Folgeexperimenten (TX-Exp 3 und 4) wurden lediglich Kontrollgruppen mit erhöhter Zellzahl und Zusatz von Milzzellen (MZ) ins Transplantat (1×10^7 KM und 5×10^6 MZ bzw. 3×10^7 KM und 5×10^6 MZ) unter Mitführung von Bestrahlungskontrollen untersucht (vgl. Tabelle 1).

Im Transplantationsexperiment 5 (TX-Exp 5) wurden allogene Knochenmark, Milzzellen und regulatorische T-Zellen in erhöhter Zahl transplantiert: die Versuchsgruppe erhielt 3×10^7 KM, 5×10^6 MZ und $1,5 \times 10^6$ T_{regs}, die Kontrollgruppe 3×10^7 KM und 5×10^6 MZ (vgl. Tabelle 1).

Alle Gruppen (Kontroll-, Versuchs- und Bestrahlungskontrollgruppen) aus allen fünf Transplantationsexperimenten bestanden aus 4 Empfängertieren.

Tabelle 1: Übersicht über die Transplantationsexperimente und deren Gruppen.

Oben Bei syngener Transplantation (Transplantationsexperiment 1 (TX-Exp 1)) wurden der Versuchsgruppe 2×10^6 Knochenmarkzellen (KM) und 1×10^6 CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (T_{regs}) transplantiert, die Kontrollgruppe erhielt 2×10^6 KM. **Unten** Bei den allogenen Transplantationsexperimenten (TX-Exp 2 bis 5) wurde zunächst die Zellzahl aus dem syngenem Transplantationsexperiment (TX-Exp 1) übernommen (TX-Exp 2). In den Transplantationsexperimenten 3 und 4 wurden lediglich Kontrollgruppen durchgeführt, bei denen die Zellzahlen im Transplantat erhöht wurden und zusätzlich Milzzellen (MZ) zum Einsatz kamen. Im letzten Transplantationsexperiment (TX-Exp 5) bekam die Versuchsgruppe das Transplantat mit der höchsten Zellzahl (3×10^7 KM + 5×10^6 MZ) unter Zusatz von $1,5 \times 10^6$ T_{regs}. Als Kontrollgruppe wurde die Gruppe aus TX-Exp 4 wiederholt (3×10^7 KM + 5×10^6 MZ).

Bei allen Transplantationsexperimenten wurde eine Bestrahlungskontrollgruppe mitgeführt. Diese Tiere bekamen nach der Konditionierung (Ganzkörperbestrahlung) 0,9%ige Natriumchloridlösung in die laterale Schwanzvene gespritzt. Alle Gruppen (Versuchs-, Kontroll- und Bestrahlungskontrollgruppe) aller Experimente bestanden aus 4 Tieren und jedes Transplantationsexperiment wurde einmal durchgeführt.

s y n g e n	C57Bl/6 in C57Bl/6- TTG	TX-Exp 1	Versuchsgruppe	2×10^6 KM + 1×10^6 T _{regs}
			Kontrollgruppe	2×10^6 KM

a l l o g e n	Balb/c in TTG	TX-Exp 2	Versuchsgruppe	2×10^6 KM + 1×10^6 T _{regs}
			Kontrollgruppe	2×10^6 KM
		TX-Exp 3	Kontrollgruppe	1×10^7 KM + 5×10^6 MZ
		TX-Exp 4	Kontrollgruppe	3×10^7 KM + 5×10^6 MZ
		TX-Exp 5	Versuchsgruppe	3×10^7 KM + 5×10^6 MZ + $1,5 \times 10^6$ T _{regs}
			Kontrollgruppe	3×10^7 KM + 5×10^6 MZ

3.3.5.3 Gewicht, klinisches Scoring

Das Körpergewicht ist eine objektive Messgröße, deren Bestimmung einen Schluss auf den Gesundheitszustand des Tieres zulässt. Die Tiere wurden täglich zur gleichen Uhrzeit gewogen.

Allein der Gewichtsverlauf ist jedoch nicht ausreichend, um das Wohlbefinden bzw. den Gesundheitszustand der Tiere beurteilen zu können. Um sicher zu stellen, dass kein Tier unnötig leidet oder Schmerzen hat, wurde der klinische Zustand eines jeden Tieres während der Versuchsreihen anhand eines Scoring-Systems (Fress- und Trinkverhalten, Körperhaltung, Hautbeschaffenheit, Fellpflege, Gewicht) erfasst. Durch das Einbeziehen mehrerer Messgrößen erlaubt das Schema nach COOKE et al. (1996) eine genauere Einschätzung des Wohlbefindens bzw. Gesundheitszustandes der Tiere. Ist das Allgemeinbefinden eines Tieres sehr stark beeinträchtigt (Score-Wert > 8), wurde der Versuch vorzeitig beendet und das Tier im Sinne des Tierschutzes unverzüglich euthanasiert.

3.3.5.4 Blutabnahme, Blutparameter

Für die wöchentliche Blutabnahme wurden die Mäuse einzeln mittels kurzer Inhalationsnarkose mit Diethylether anästhesiert (Ausnahmegenehmigung der Landesdirektion Leipzig für die Verwendung von Ether bei Versuchstieren (Aktenzeichen 24-9168.40)). Die Narkose wurde sorgfältig von geschultem Personal überwacht.

Mit einer Hämatokritkapillare wurde der retrobulbäre Venenplexus punktiert. Das gewonnene Blut wurde in ein mit 10 µl Heparin gefülltes 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Nach der Blutabnahme wurden die Augen der Tiere mit einer oxytetracyclin-haltigen Augensalbe versorgt und die Mäuse nach Erwachen aus der Narkose zurück in den Käfig gelegt.

Am Blood counter wurde ein Blutbild mit Differentialblutbild erstellt.

Das restliche Blut wurde für die Chimärismusanalysen mittels Durchflusszytometrie (s. 3.3.5.5) verwendet.

3.3.5.5 Chimärismusanalysen mittels Durchflusszytometrie

An den Tagen -2, 19, 26, 33 und 61 des Experiments wurden Chimärismusanalysen mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Das unter Inhalationsnarkose entnommene Blut wurde zentrifugiert (0,3 g, 10 Minuten). Das Serum wurde abgenommen und die Zellen wurden für die unterschiedlichen FACS-Ansätze in Rundboden-Röhrchen verteilt (vgl. Tabelle 2).

Tabelle 2: Ansätze für die Chimärismusanalysen mittels Durchflusszytometrie.

Links Im ersten Ansatz (Röhrchen 1) wurden alle T-Lymphozyten durch den CD3-Antikörper (CD3 FITC) erfasst. Der murine CD4-Antikörper (muCD4 PE-Cy7) detektierte spendereigene T-Helferzellen (die dreifach transgenen Empfängermäuse exprimieren kein murines CD4 auf der Zelloberfläche), der CD8-Antikörper (CD8 Apc) die zytotoxischen T-Zellen. Der MHC-Antikörper (H2D^b PE/ H2K^d PE) wurde passend zum Spender gewählt, d.h. bei syngener Transplantation (Spender: wildtyp C57Bl/6) wurde der H2D^b-Antikörper eingesetzt, bei allogener Transplantation (Spender: wildtyp Balb/c) erfasste der H2K^d-Antikörper die Spenderzellen. **Mitte** Im zweiten Ansatz (Röhrchen 2) detektierte der murine CD4-Antikörper (muCD4 PE) spendereigene T-Helferzellen, der humane CD4-Antikörper (huCD4 Apc) empfängereigene T-Helferzellen. Der humane MHC-Antikörper (HLA-DR FITC) erfasste empfängereigene antigenpräsentierende Zellen. **Rechts** Der dritte Ansatz (Röhrchen 3) diente der Untersuchung regulatorischer T-Zellen (T_{regs}). Mit Hilfe des murinen CD4-Antikörpers (muCD4 PE-Cy7) konnte zwischen T_{regs} vom Empfänger (da es sich um dreifach transgene Mäuse handelt, exprimieren sie kein murines CD4-Molekül auf der Zelloberfläche) und vom Spender (auf diesen T_{regs} ist murines CD4 nachweisbar) unterschieden werden.

Röhrchen 1	Röhrchen 2	Röhrchen 3
CD3 FITC	muCD4 PE	CD3 FITC
muCD4 PE-Cy7	huCD4 Apc	muCD4 PE-Cy7
CD8 Apc	HLA-DR FITC	CD25 PE
H2D ^b PE/ H2K ^d PE		FoxP3 Apc

Die Zellen wurden mit den Antikörpern 20 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml des zehnfach mit Wasser verdünnten Lysepuffers auf die Zellen gegeben und für 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Danach wurden die Zellen zweimal mit 2 ml PBS gewaschen (300 g, 5 Minuten). Für die intrazelluläre FoxP3-Färbung wurden die Zellen weiter nach Herstellerprotokoll behandelt: Zunächst wurden die Zellen 30 Minuten bei 4°C permeabilisiert, dann unspezifische Bindungen durch Blockierung der Fc-Rezeptoren gesättigt und anschließend 30 Minuten bei 4°C mit dem FoxP3-Antikörper inkubiert.

Die durchflusszytometrischen Messungen erfolgten direkt im Anschluss an die Färbung an den BD Geräten FACSCanto™ II mit FACSDiva Software (Ansätze 1 und 2) und FACScalibur mit der CellQuest Pro Software (Ansatz 3).

3.3.5.6 Histologie

Am Ende des Tierexperiments (Tag 61 nach Transplantation) wurden die Hintergliedmaßen der Tiere für die histologische Untersuchung präpariert. Hierzu wurden die Beine zunächst für 7 Tage in Formalin fixiert. Vor dem Einbetten der Gliedmaße in Paraffin wurde das Knochenmaterial entkalkt. Hierzu wurden die Beine zunächst für 2 Stunden gewässert, gefolgt von 1 bis 4 Tagen Inkubation in Entkalkerlösung (Osteosoft®). Die Härte des Knochengewebes wurde mit Hilfe einer Stecknadel getestet. Bei ausreichender Weichheit wurden die Beine für 2 Stunden gewässert und im Anschluss in einer aufsteigenden

Alkoholreihe entwässert: 2 mal 1 Stunde in 70%igem Alkohol, 2 mal 1 Stunde in 80%igem Alkohol, 2 mal 1 Stunde in 90%igem Alkohol, 2 mal 1 Stunde in 100%igem Alkohol, 1 Stunde in Isopropanol, 24 Stunden in Methylbenzoat, 2 mal 24 Stunden in Paraffin. Anschließend wurden die Beine in Paraffin eingebettet und bis zum Anfertigen der Schnitte bzw. der Färbung bei Raumtemperatur gelagert.

Es wurden 5 µm dicke Längsschnitte der gesamten Hintergliedmaße hergestellt und mit Kernechtrubin-Anilinblau-Orange (KAO-Färbung) gefärbt. Hierfür wurden die Schnitte zunächst entparaffiniert: 2 mal 5 Minuten Xylol, 5 Minuten 100% Alkohol, 5 Minuten 90% Alkohol, 5 Minuten 80% Alkohol, 5 Minuten 70% Alkohol, 5 Minuten destilliertes Wasser. Die entparaffinierten Schnitte wurden zunächst für 5 Minuten mit einer Kernechtrubinlösung gefärbt. Nach kurzem Spülen in destilliertem Wasser wurde für 5 Minuten mit 5%iger Wolfrumphosphorsäure inkubiert und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Danach wurde für 8 Minuten die Anilinblau-Orange nach HALMI-KONCNY auf die Schnitte gegeben. Es wurde kurz in 96%igem Alkohol differenziert und anschließend mit absolutem Isopropanol entwässert. Vor dem Eindecken mit Entellan wurden die Schnitte 2 mal in Xylol gehalten.

Nach Trocknen des Entellans wurden die Schnitte mikroskopisch analysiert und fotografiert. Bei der KAO-Färbung stellen sich Zellkerne intensiv rot dar, kollagenes Bindegewebe färbt sich blau, Erythrozyten sind orange, Gliafasern rot und Zellplasma sowie Muskulatur rotorange.

3.3.6 Statistik

Die Daten zur Zellausbeute aus Milz bzw. Buffy Coat und zur Ausbeute an CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Abbildungen 5 und 8) wurden als Median, oberes und unteres Quartil, Maximum und Minimum dargestellt. Alle anderen Graphen repräsentieren die Daten als Mittelwert mit Standardabweichung. Jedes Transplantationsexperiment wurde einmal durchgeführt und die Standardabweichungen stellen die Abweichungen der Replikate dar. Alle Gruppen der Transplantationsexperimente bestanden aus 4 Tieren.

Die Graphen der Differentialblutbilder (Abbildungen 16 und 30) wurden mit Microsoft® Office Excel 2003, alle anderen mit SigmaPlot 10.0 erstellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe von SigmaStat 3.5 (SYSTAT, Erkrath, Germany).

4 Ergebnisse

4.1 Humane CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

4.1.1 Gewinnung humaner mononukleärer Zellen (PBMCs) und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Aus humanen Buffy Coats (BC) gesunder, freiwilliger Spender wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation mononukleäre Zellen gewonnen, um aus diesen humane CD4⁺CD25⁺ T-Zellen zu isolieren. Es galt zu ermitteln, wie viele Zellen aus einem BC zu gewinnen sind (vgl. Abbildung 5 A), bzw. wie viele CD4⁺CD25⁺ T-Zellen durch magnetische Separation aus einem BC zu erhalten sind (vgl. Abbildung 5 B). Die humanen separierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden zur Vorbereitung für mögliche Kotransferstudien *in vitro* charakterisiert und die erhaltenen Zahlen ließen Rückschlüsse auf die Menge benötigten Spendermaterials zu. Aus einem Buffy Coat wurden $6,47 \times 10^8 \pm 2,12 \times 10^8$ mononukleäre Zellen gewonnen (n=14, Median= $6,14 \times 10^8$), von denen wiederum $0,19\% \pm 0,16\%$ CD4⁺CD25⁺ waren (n=9, Median=0,16%). Daraus konnte errechnet werden, wie viele Zellen für die Separation eingesetzt werden mussten bzw. wie viele Buffy Coats benötigt wurden, um die gewünschte Anzahl CD4⁺CD25⁺ T-Zellen für Folgeexperimente (Durchflusszytometrie, ELISpot) zu erhalten.

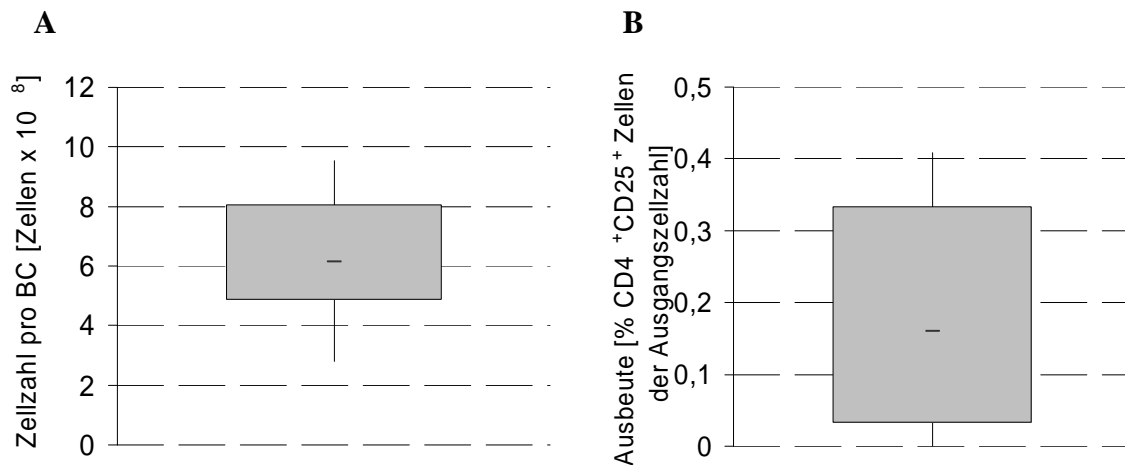


Abbildung 5: Anzahl gewonnener mononukleärer Zellen aus einem Buffy Coat und Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach magnetischer Zellseparation.

A Aus einem Buffy Coat eines humanen Spenders wurden mittels Dichtegradientenzentrifugation im Median $6,14 \times 10^8$ mononukleäre Zellen gewonnen (n=14). **B** Durch magnetische Zellseparation (MACS-Separation) betrug die Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen im Median 0,16% der eingesetzten Ausgangszellzahl (n=9).

4.1.2 Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression humaner separierter CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Die humanen isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden mittels Durchflusszytometrie untersucht und die Anzahl CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen ermittelt. Somit wurde der Erfolg der magnetischen Zellseparation kontrolliert und die Reinheit der CD4⁺CD25⁺ T-Zellen ermittelt (vgl. Abbildung 6). Der Anteil CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen wurde von 0,92% ± 1,01% in der Ausgangsfraktion (Buffy Coat) auf 19,77% ± 15,42% in der separierten Fraktion (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) signifikant (P=0,002) erhöht (Anzahl der Separationen: n=9).

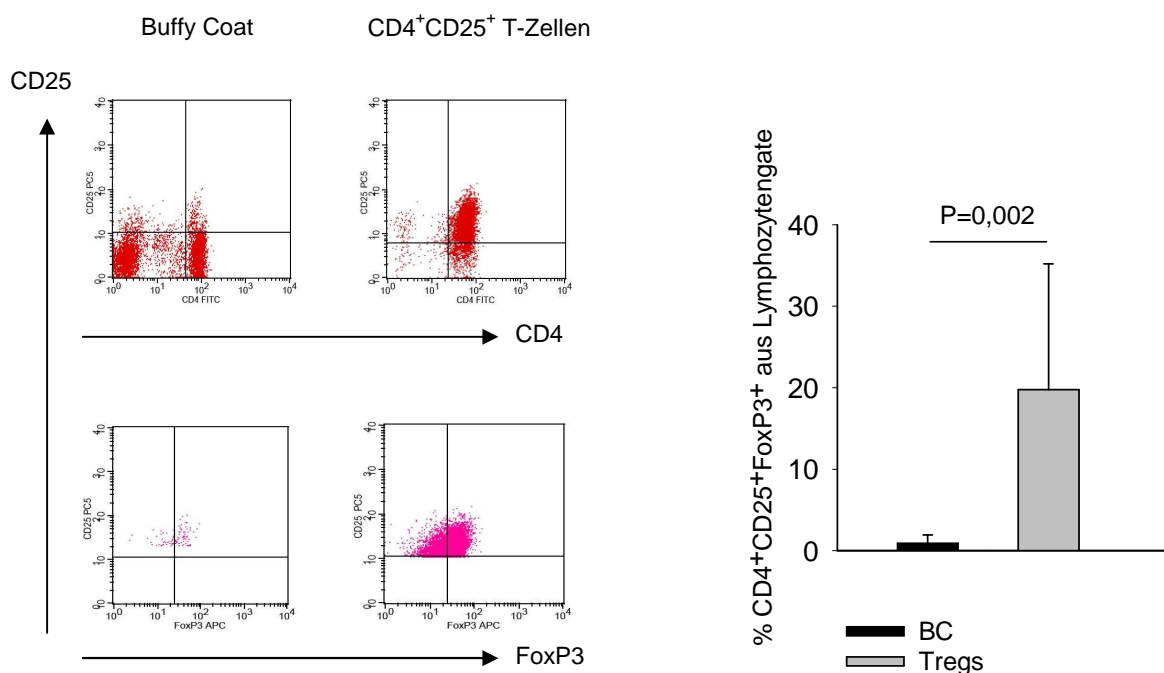


Abbildung 6: Durchflusszytometrische Analyse humaner Zellen vor (Buffy Coat) und nach (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) magnetischer Zellseparation.

Vor der Separation (MACS-Separation) waren 0,92% ± 1,01% der Zellen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, nach Separation konnte der Anteil CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen signifikant (P=0,002) auf 19,77% ± 15,42% erhöht werden (Anzahl der Separationen: n=9). Die roten Punkte in den Durchflusszytometriebildern sind alle Lymphozyten des Ansatzes („Lymphozyten-Gate“), die rosanen Punkte stellen alle CD4⁺CD25⁺ Zellen („CD4⁺CD25⁺-Gate“) dar.

4.1.3 Zytokinproduktion von Buffy Coat-Zellen und humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Um die humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen weiter zu charakterisieren, wurde deren Zytokinproduktion *in vitro* untersucht und mit der von Buffy Coat-Zellen verglichen. Während T-Effektorzellen nach Aktivierung große Mengen Interleukin-2 (IL-2) sezernieren, fehlt die Produktion dieses Zytokins typischerweise bei CD4⁺CD25⁺ regulatorischen T-Zellen. Auch Interferon- γ (IFN- γ) ist ein proinflammatorisches Zytokin, das von T-Effektorzellen, nicht jedoch von regulatorischen T-Zellen gebildet und freigesetzt wird.

Die Sekretion von humanem IL-2 wurde nur bei BC-Zellen nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) beobachtet (296 ± 12 spots/ Testeinheit), BC-Zellen ohne Stimulation und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (mit und ohne Stimulation) produzierten kein IL-2 (vgl. Abbildung 7 A).

IFN- γ wurde von BC-Zellen nach Stimulation vermehrt sezerniert (622 ± 51 spots/ Testeinheit) im Vergleich zu unstimulierten BC-Zellen (461 ± 46 spots/ Testeinheit). $CD4^+CD25^+$ T-Zellen produzieren auch nach Stimulation kein IFN- γ (vgl. Abbildung 7 B).

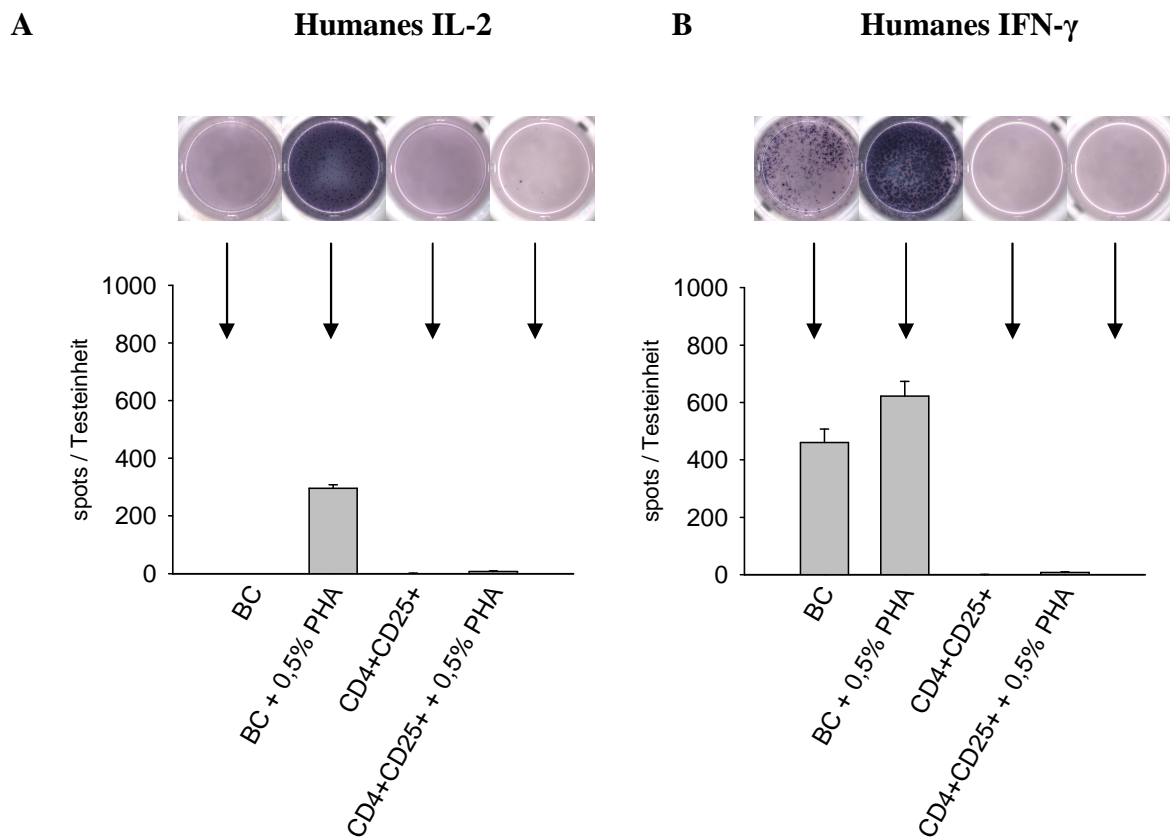


Abbildung 7: Nachweis der Produktion von humanem Interleukin-2 (IL-2) und humanem Interferon- γ (IFN- γ) durch Buffy Coat- (BC) und separierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen.

A BC-Zellen sezernierten nur nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) IL-2 (296 ± 12 spots/ Testeinheit). Unstimulierte BC-Zellen, sowie $CD4^+CD25^+$ T-Zellen mit und ohne Stimulation produzierten kein IL-2. **B** IFN- γ wurde von BC-Zellen ohne PHA-Stimulation weniger freigesetzt (461 ± 46 spots/ Testeinheit) als nach Stimulation (622 ± 51 spots/ Testeinheit). $CD4^+CD25^+$ T-Zellen sezernierten weder ohne noch mit PHA-Stimulation IFN- γ . Bilder einzelner Vertiefungen und Quantifizierung durch Zählung der spots/ Testeinheit.

4.2 Murine CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

4.2.1 Gewinnung muriner Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Für die geplanten syngen und allogenen Transplantationsversuche konnten die humanen CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nicht verwendet werden. Die Technik der Gewinnung bzw. die Separation wurde deshalb auf murine Zellen übertragen. Die für die Transplantation benötigten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden aus Milzzellen von wildtyp C57Bl/6- und Balb/c-Spendertieren gewonnen. Um die Anzahl benötigter Spendertiere für die Folgeexperimente (Durchflusszytometrie, ELISpot und insbesondere Transplantationsexperimente) zu berechnen, wurde zunächst ermittelt, wie viele Milzzellen aus der Milz eines Spendertieres zu gewinnen waren (vgl. Abbildung 8 A), bzw. wie hoch die Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach magnetischer Separation (MACS-Separation) war (vgl. Abbildung 8 B).

Aus der Milz eines C57Bl/6-Spendertiers wurden $1,30 \times 10^8 \pm 0,48 \times 10^8$ Zellen gewonnen ($n=16$, Median= $1,27 \times 10^8$), die Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach MACS-Separation betrug bei C57Bl/6-Tieren $0,94\% \pm 0,42\%$ ($n=11$, Median= $0,81\%$). Bei Balb/c-Tieren wurden aus einer Milz $1,32 \times 10^8 \pm 0,54 \times 10^8$ Zellen gewonnen ($n=10$, Median= $1,40 \times 10^8$) und die MACS-Separation ergab eine Ausbeute von $0,59\% \pm 0,24\%$ ($n=3$, Median= $0,73\%$).

Der t-Test zeigte, dass es zwischen den zwei Mausstämmen keine signifikanten Unterschiede sowohl in der Anzahl gewonnener Zellen aus einer Milz, als auch in der Ausbeute von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus den Milzzellen mittels MACS-Separation gab.

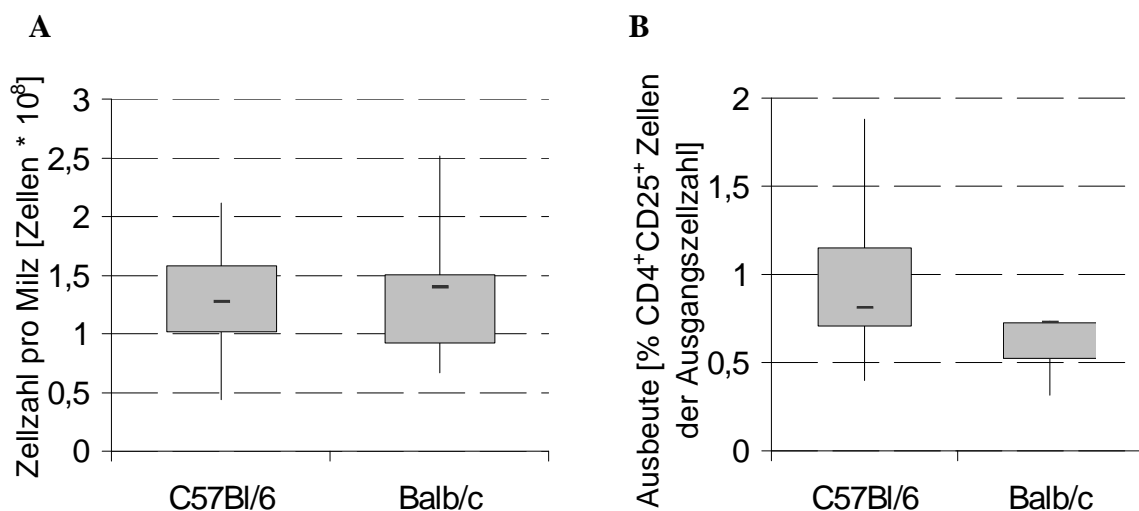


Abbildung 8: Anzahl gewonnener Zellen aus der Milz einer wildtyp C57Bl/6- bzw. wildtyp Balb/c-Maus und Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach magnetischer Zellseparation.

A Aus der Milz einer C57Bl/6-Maus wurden im Median $1,27 \times 10^8$ Zellen gewonnen ($n=16$), aus der Milz einer Balb/c-Maus konnten im Median $1,40 \times 10^8$ Zellen isoliert werden ($n=10$). **B** Durch magnetische Zellseparation (MACS-Separation) betrug die Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen bei C57Bl/6-Mäusen im Median 0,81% der eingesetzten Ausgangszellzahl ($n=11$), bei Balb/c-Mäusen 0,73% ($n=3$). Sowohl in der Anzahl gewonnener Zellen aus einer Milz, als auch in der Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach MACS-Separation gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den zwei Mausstämmen.

4.2.2 Durchflusszytometrische Analyse der FoxP3-Expression muriner separierter $CD4^+CD25^+$ T-Zellen

Die mittels MACS-Separation gewonnenen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurden auf ihre FoxP3-Expression durchflusszytometrisch analysiert, um den Erfolg der Separation zu kontrollieren, bzw. um die Reinheit der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zu bestimmen.

Bei C57Bl/6-Tieren wurde der Anteil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen von $1,65\% \pm 0,84\%$ in der Ausgangsfraction (Milzzellen) auf $59,21\% \pm 16,12\%$ ($n=8$) in der separierten Fraction ($CD4^+CD25^+$ T-Zellen) erhöht. Der Anteil $FoxP3^+$ T-Zellen konnte durch die MACS-Separation signifikant erhöht werden ($P=<0,001$) (Anzahl der Separationen: $n=8$) (vgl. Abbildung 9). Bei Balb/c-Mäusen betrug der Anteil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen in der Ausgangsfraction (Milzzellen) $1,52\% \pm 0,86\%$, in der separierten Fraction ($CD4^+CD25^+$ T-Zellen) $64,64\% \pm 16,61\%$ ($n=3$). Die Erhöhung des Anteils $FoxP3^+$ T-Zellen durch die Separation war signifikant ($P=0,003$) (Anzahl der Separationen: $n=3$) (vgl. Abbildung 10).

Die statistische Untersuchung mittels t-Test ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Mausstämmen.

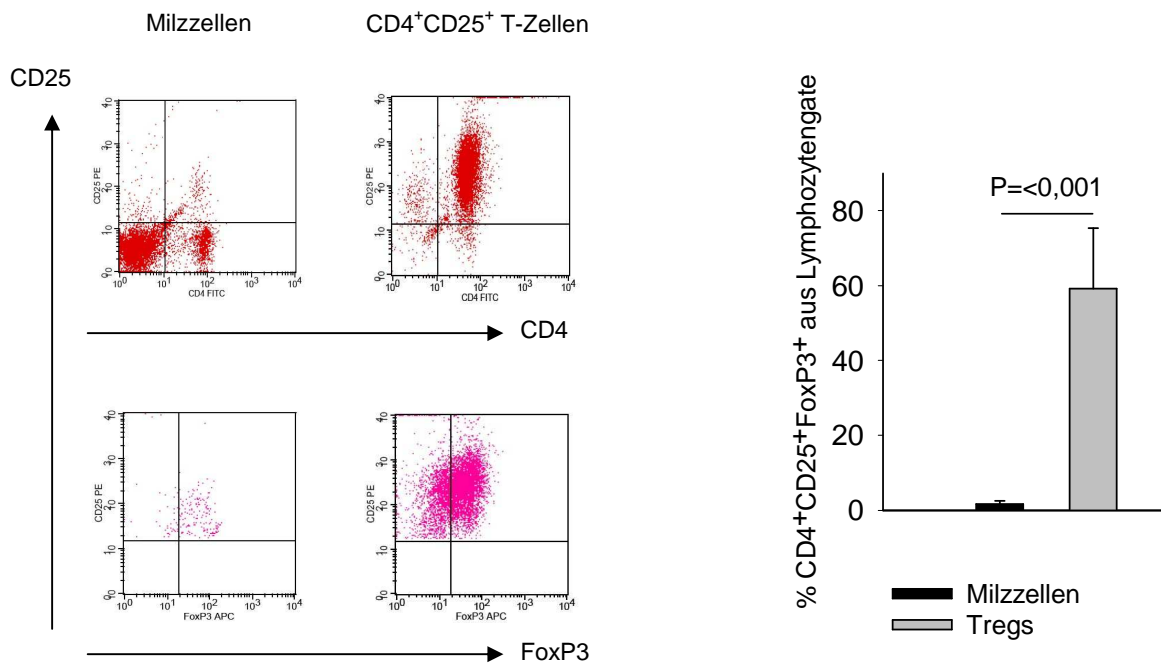


Abbildung 9: Durchflusszytometrische Analyse muriner C57Bl/6-Zellen vor (Milzzellen) und nach ($CD4^+CD25^+$ T-Zellen) magnetischer Zellseparation.

Vor der Separation (MACS-Separation) waren $1,65\% \pm 0,84\%$ der Zellen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$, nach Separation konnte der Anteil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen signifikant ($P=<0,001$) auf $59,21\% \pm 16,12\%$ erhöht werden (Anzahl der Separationen: $n=8$). Die roten Punkte in den Durchflusszytometriebildern sind alle Lymphozyten des Ansatzes („Lymphozyten-Gate“), die rosanen Punkte stellen alle $CD4^+CD25^+$ Zellen („ $CD4^+CD25^+$ -Gate“) dar.

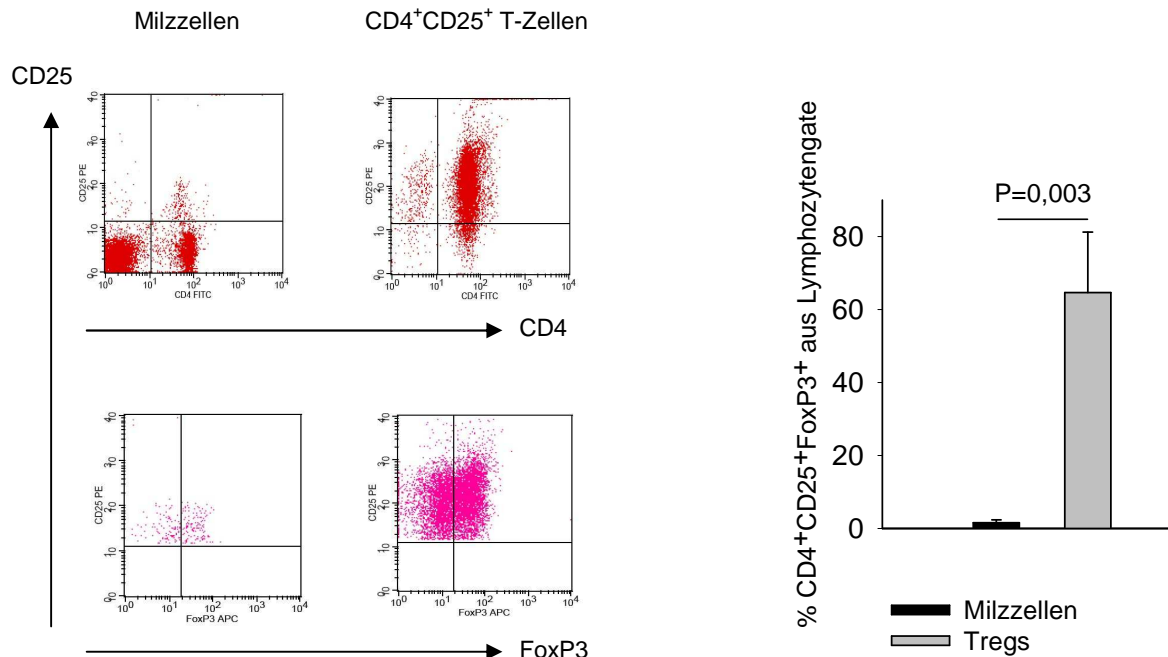


Abbildung 10: Durchflusszytometrische Analyse muriner Balb/c-Zellen vor (Milzzellen) und nach (CD4⁺CD25⁺ T-Zellen) magnetischer Zellseparation.

Vor der Separation (MACS-Separation) waren 1,52% ± 0,86% der Zellen CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺, nach Separation konnte der Anteil CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen signifikant (P=0,003) auf 64,64% ± 16,61% erhöht werden (Anzahl der Separationen: n=3). Die roten Punkte in den Durchflusszytometriebildern sind alle Lymphozyten des Ansatzes („Lymphozyten-Gate“), die rosanen Punkte stellen alle CD4⁺CD25⁺ Zellen („CD4⁺CD25⁺-Gate“) dar.

4.2.3 Interleukin-2-Produktion von Milzzellen und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Die separierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden zur weiteren Charakterisierung auf ihre Produktion des proinflammatorischen Zytokins Interleukin-2 (IL-2) untersucht. Im Vergleich zu Milzzellen, die nach Aktivierung große Mengen IL-2 freisetzen, produzieren CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen kein IL-2.

Ohne Stimulation produzierten weder Milz- noch CD4⁺CD25⁺ T-Zellen von wildtyp C57Bl/6-Mäusen Interleukin-2 (IL-2).

Nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) wurde bei Milzzellen mehr IL-2 detektiert (456 ± 31 spots/ Testeinheit) als bei CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (22 ± 4,36 spots/ Testeinheit) (vgl. Abbildung 11).

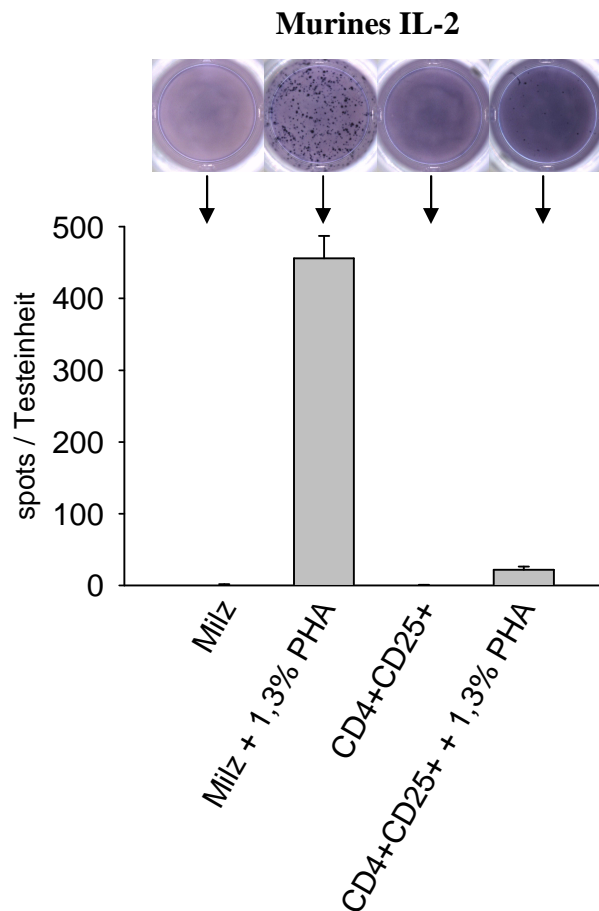


Abbildung 11: Nachweis der Produktion von murinem Interleukin-2 (IL-2) durch Milzzellen (Milz) und separierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von wildtyp C57Bl/6-Mäusen.

Milzzellen sezernierten nur nach Stimulation mit Phytohämagglutinin (PHA) IL-2 (456 ± 31 spots/ Testeinheit). Unstimulierte Milz- und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen produzierten kein IL-2, stimulierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen setzten geringe Mengen IL-2 frei ($22 \pm 4,36$ spots/ Testeinheit). Bilder einzelner Vertiefungen und Quantifizierung durch Zählung der spots/ Testeinheit.

4.3 Zellkultur muriner Milzzellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen

Murine Milzzellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von C57Bl/6-Wildtypmäusen wurden direkt nach Gewinnung bzw. nach Separation auf Zellkulturplatten ausgesetzt und das Wachstumsverhalten und die Veränderungen des Phänotyps *in vitro* wurden untersucht.

4.3.1 Wachstumsverhalten muriner $CD4^+CD25^+$ T-Zellen *in vitro*

Die Zellzahlen muriner Milzzellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurden an den Tagen 0 und 7 nach Aussetzen mittels Zählung in einer Neubauer-Zählkammer nach Trypanblau-Färbung ermittelt. Die Milzzellen waren innerhalb von 7 Tagen um das 8,2 fache expandiert, die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen hatten sich nahezu verdoppelt (1,6 fache Expansion) (vgl. Abbildung 12). In den Vertiefungen der Milzzellen war am Tag 4 der Zellkultur der Boden der Zellkulturplatte komplett mit Zellen bedeckt. In den Milzzellen sind teilungsfreudige T-Effektorzellen enthalten, die nach Aktivierung und unter Zusatz von Interleukin-2 stark

proliferieren. Bei den $CD4^+CD25^+$ T-Zellen hingegen waren noch zellfreie Areale auf der Platte zu finden (vgl. Abbildung 13).

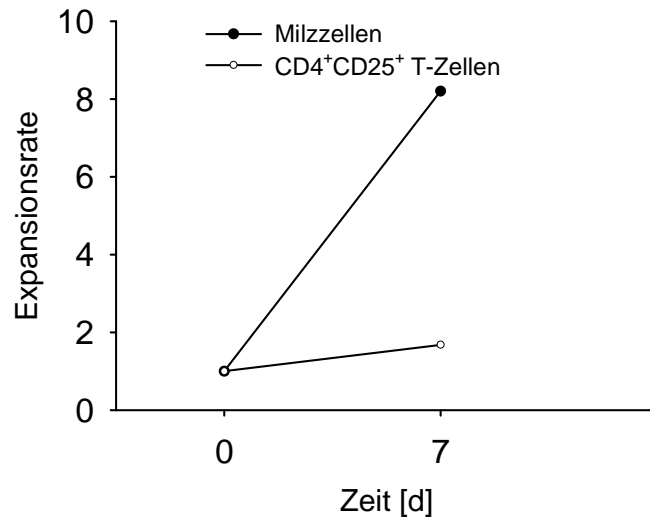


Abbildung 12: Wachstumskurve von Milz- und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von wildtyp C57Bl/6-Mäusen nach Stimulation.

Milzzellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen wurden mit Hilfe des T Cell Activation/ Expansion Kits expandiert. Pro Vertiefung einer Zellkulturplatte wurden 2×10^6 Zellen eingesetzt. Diese wurden mit 4×10^6 Stimulatorbeads (MACSiBeads mit CD3- und CD28-Antikörpern beladen) und 2000 U/ml murinem rekombinanten Interleukin-2 versetzt. Über einen Kultivierungszeitraum von 7 Tagen proliferierten die Milzzellen um das 8,2 fache, $CD4^+CD25^+$ T-Zellen vervielfachten sich um das 1,6 fache.

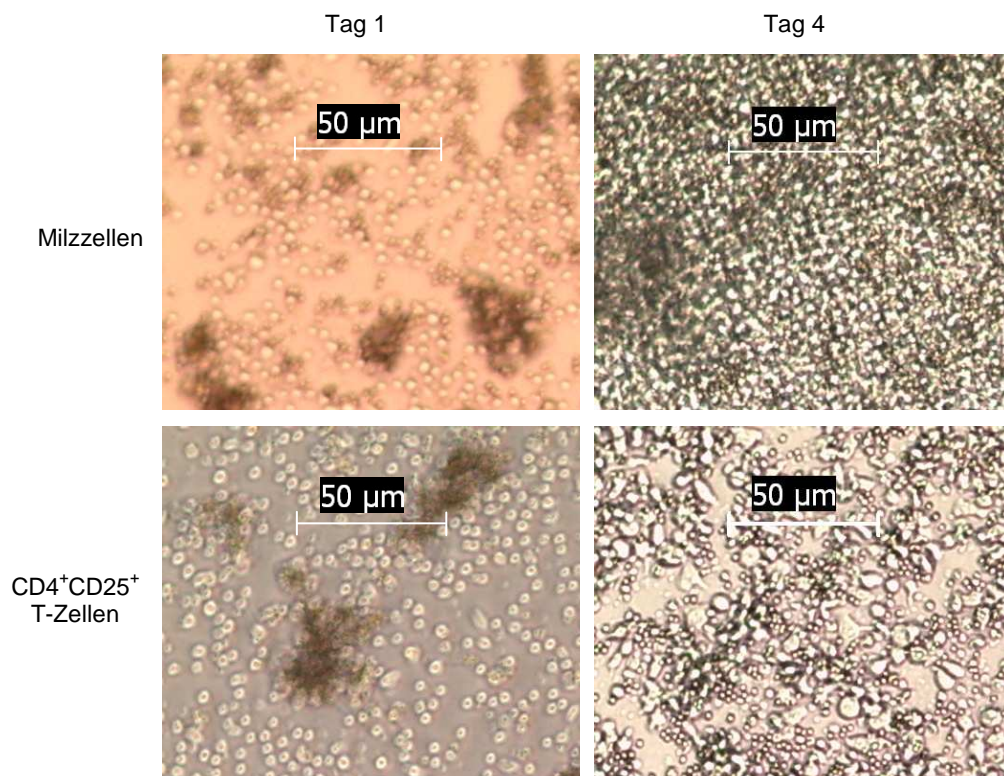


Abbildung 13: Mikroskopische Aufnahmen der Zellkultur von Milz- und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen.

Das Wachstum der stimulierten Milz- und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (vgl. Abbildung 12) wurde während der Kultur an den Tagen 1 und 4 beurteilt. **Rechts** An Tag 1 der Expansion sind bei beiden Zelltypen (Milzzellen und $CD4^+CD25^+$ T-Zellen) Zellansammlungen (Cluster) zu sehen. **Links** Nach 4 Tagen haben die Milzzellen den Boden der Zellkulturplatte komplett bedeckt, die $CD4^+CD25^+$ T-Zellen haben keinen durchgehenden Zellrasen gebildet.

4.3.2 Phänotypische Veränderungen muriner $CD4^+CD25^+$ T-Zellen in der Zellkultur

Frisch separierte und 7 Tage alte, kultivierte $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von wildtyp C57Bl/6-Mäusen wurden auf die FoxP3-Expression durchflusszytometrisch untersucht, da oft beschrieben wurde, dass regulatorische T-Zellen bei Expansion *in vitro* die FoxP3-Expression verlieren. Nur bei hoher FoxP3-Expression sind jedoch die suppressiven Eigenschaften regulatorische T-Zellen vorhanden.

Der Anteil $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen an Tag 0 betrug $74,04\% \pm 10,17\%$ (n=3), an Tag 7 waren noch $3,52\% \pm 2,29\%$ der Zellen $CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (n=2) (vgl. Abbildung 14 A und B).

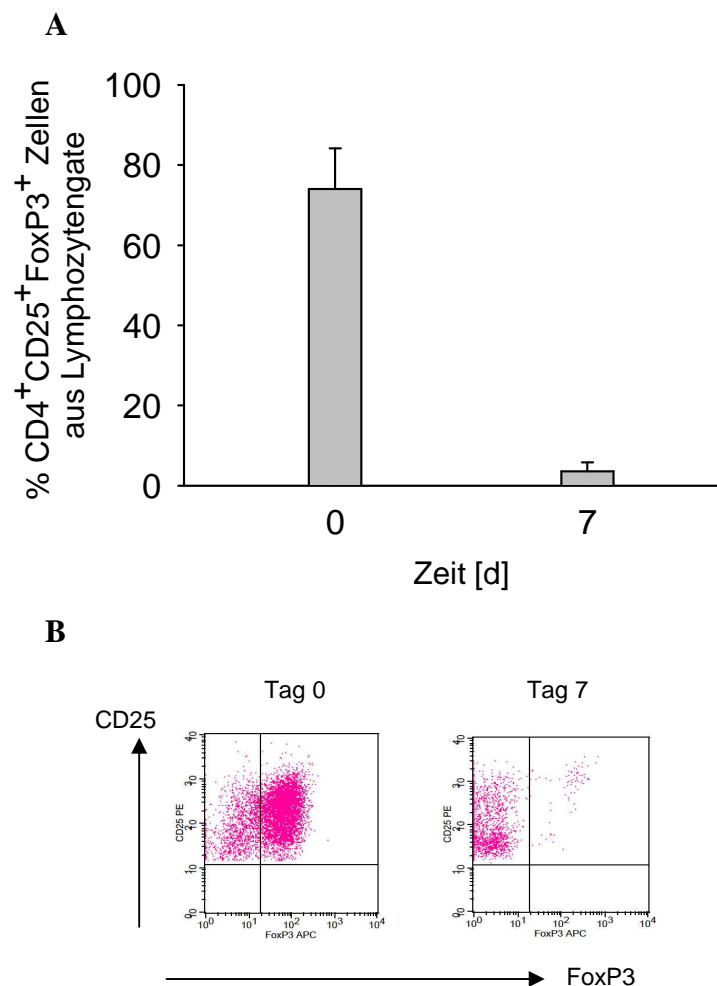


Abbildung 14: FoxP3-Expression $CD4^+CD25^+$ T-Zellen von wildtyp C57Bl/6-Mäusen vor (Tag 0) und nach 7 Tagen (Tag 7) Expansion *in vitro*.

A Bei frisch separierten $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (Tag 0) betrug der Anteil $FoxP3^+$ Zellen $74,04\% \pm 10,17\%$ (n=3). Nach 7 Tagen Expansion in der Zellkultur waren noch $3,52\% \pm 2,29\%$ der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen $FoxP3^+$ (n=2). **B** Die rosanen Punkte in den Durchflusszytometriebildern stellen alle $CD4^+CD25^+$ Zellen des Ansatzes („ $CD4^+CD25^+$ -Gate“) dar.

4.4 Knochenmark und T_{regs}-Kotransplantation nach Bestrahlung im dreifach transgenen Mausmodell

4.4.1 Syngene Transplantation von Knochenmark und T_{regs}-Kotransplantation in dreifach transgene Empfängertiere

4.4.1.1 Überleben dreifach transgener Mäuse nach syngener Transplantation von Knochenmark mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation

Aus wildtyp C57Bl/6-Spendertieren wurden Knochenmarkzellen und T_{regs} (mittels magnetischer Separation CD4⁺CD25⁺ T-Zellen aus Milzzellen) gewonnen und in bestrahlte dreifach transgene Empfängertiere (C57Bl/6-TTG) syngen transplantiert (vgl. Abbildung 4). Nach Bestrahlung wurden die Empfängertiere mit 2x10⁶ Knochenmark und 1x10⁶ CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Versuchsgruppe) bzw. 2x10⁶ Knochenmark (Kontrollgruppe) transplantiert (TX-Exp 1). Als Bestrahlungskontrolle dienten bestrahlte und mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelte Tiere (vgl. Tabelle 1).

Die syngen mit und ohne CD4⁺CD25⁺ T-Zellen transplantierten Tiere (Versuchs- und Kontrollgruppe) überlebten zu 100% bis zum Ende des Experiments (Tag 61). Die Bestrahlungskontrolle verstarb innerhalb von 18 Tagen (vgl. Abbildung 15).

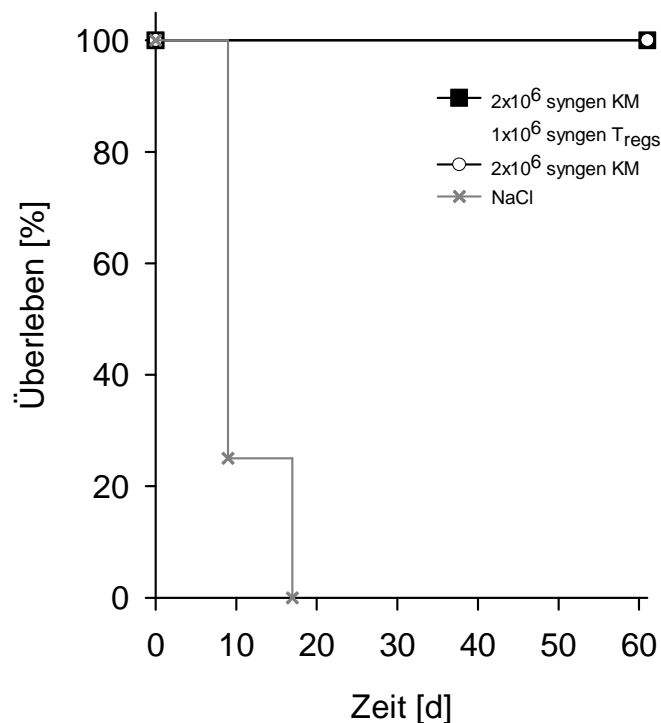


Abbildung 15: Überleben dreifach transgener C57Bl/6-TTG-Empfängermäuse nach syngener Transplantation. Versuchs- (2x10⁶ Knochenmarkzellen (KM) mit 1x10⁶ T_{regs}-Kotransplantation) und Kontrollgruppe (2x10⁶ KM) überlebten zu 100% bis zum Ende des Experiments (Tag 61). Die Bestrahlungskontrollgruppe (NaCl) verstarb innerhalb von 18 Tagen.

4.4.1.2 Gewichtsverlauf nach syngener Transplantation

Über den gesamten Zeitraum der Transplantationsversuche wurde täglich das Gewicht jedes Tieres erfasst. Versuchs- und Kontrollgruppe hatten divergierende Ausgangsgewichte, die auf unterschiedliches Alter der Tiere zurückzuführen waren (vgl. Abbildung 16 A). Die Zucht der dreifach transgenen Maus ergibt nicht immer genügend gleich alte Tiere, so dass Gewichtsunterschiede zwischen den Gruppen toleriert werden müssen. Vorherige in der Arbeitsgruppe durchgeführte Experimente mit dreifach transgenen Mäusen zeigten immer einen charakteristischen Gewichtsabfall nach der Bestrahlung (Daten nicht gezeigt). Die Darstellung der Gewichte in % des Ausgangsgewichts (vgl. Abbildung 16 B) verdeutlicht, dass die Tiere, die zusätzlich mit 1×10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen behandelt wurden (Versuchsgruppe), bis Tag 6 nach Transplantation deutlich an Gewicht verloren. Nach syngener Transplantation von Knochenmark (Kontrollgruppe) war der anfängliche Gewichtsverlust nach Bestrahlung nicht so ausgeprägt.

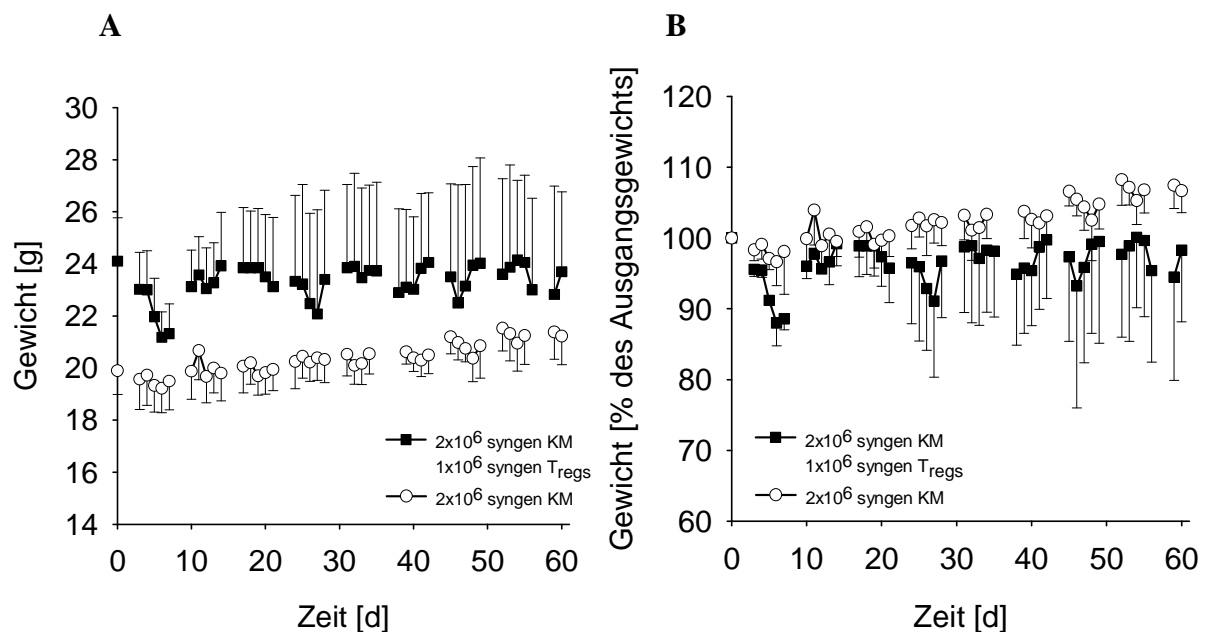


Abbildung 16: Gewichtsverlauf nach syngener Transplantation **A** absolut und **B** in % des Ausgangsgewichts. Die Tiere der Versuchsgruppe (2×10^6 syngene Knochenmarkszellen (KM) mit T_{regs} -Kotransplantation) nahmen zunächst (bis Tag 6) nach der Bestrahlung und Transplantation deutlich ab. Die Kontrollgruppe (2×10^6 syngene KM) verlor nach der Bestrahlung nur wenig an Gewicht. Die unterschiedlichen Ausgangsgewichte sind auf divergierendes Alter der Tiere in den Gruppen zu führen, die züchtungsbedingt entstanden sind.

4.4.1.3 Leukozytenzahl im Blut (WBC) und Differentialblutbild nach syngener Transplantation

Im Verlauf des Experiments wurde den Tieren wöchentlich Blut abgenommen und ein Blut- und Differentialblutbild erstellt.

Bis zum Tag 12 des Versuchs fielen die Leukozytenzahlen bei allen Tieren im Blut stark ab. Ab Tag 12 erholten sich Versuchs- und Kontrollgruppe wieder. Die Leukozytenzahlen stiegen an und erreichten zum Versuchsende wieder die Ausgangswerte. Bei der Versuchsgruppe (2×10^6 KM und 1×10^6 T_{regs}) fielen die Leukozyten nicht so weit wie bei der nur mit KM behandelten Kontrollgruppe ab (vgl. Abbildung 17).

Im Differentialblutbild zeigte sich zum Zeitpunkt der Leukozytopenie eine relative Granulo- und Monozytose, die mit Wiederanstieg der Leukozytenzahlen verschwand. Dabei bestand zwischen den unterschiedlichen Gruppen (mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation) kein Unterschied (vgl. Abbildung 18 A und B).

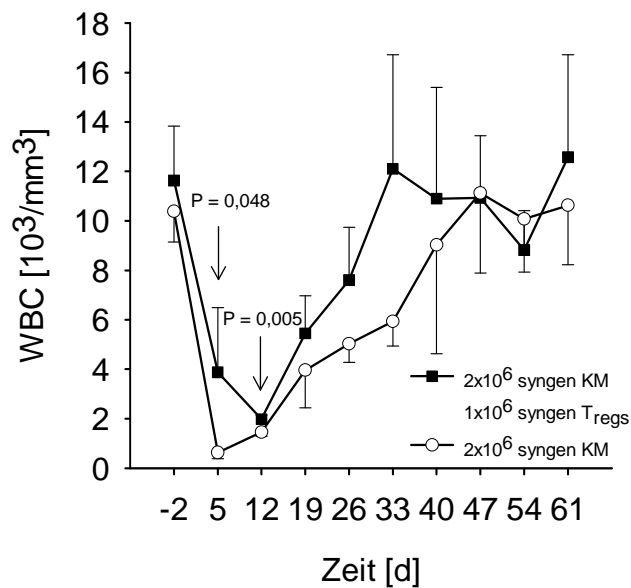


Abbildung 17: Verlauf der weißen Blutzellen (WBC) nach syngener Transplantation. Nach der Bestrahlung und Transplantation (Tag 0) sanken die Leukozytenwerte bei allen Tieren, in der Kontrollgruppe weiter als in der Versuchsgruppe. Ab Tag 12 stiegen die Werte bis zum Versuchsende wieder an.

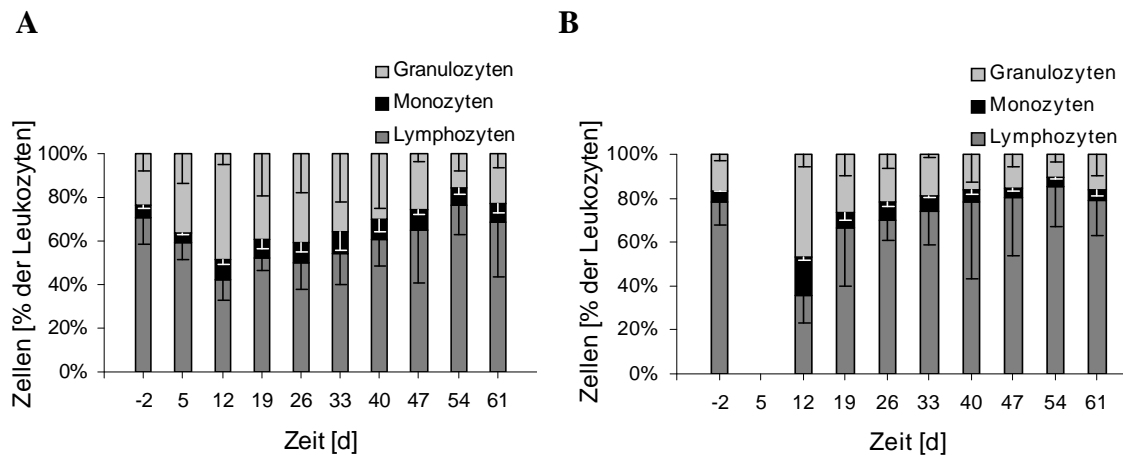


Abbildung 18: Differentialblutbild nach syngener Transplantation.

An den Tagen 5 und 12 (Zeitpunkt ausgeprägter Lymphozytopenie, vgl. Abbildung 17) zeigten die Tiere der **A** Versuchs- (2×10^6 Knochenmarkzellen (KM) mit 1×10^6 T_{regs}) und der **B** Kontrollgruppe (2×10^6 KM) eine relative Granulo- und Monozytose (an Tag 5 konnte bei der Kontrollgruppe kein Differentialblutbild erstellt werden, da der Leukozytenwert unter $1 \times 10^3/\text{mm}^3$ lag). Mit Wiederanstieg der Leukozytenzahlen (ab Tag 12) verschwanden Granulo- und Monozytose.

4.4.1.4 Chimärismusanalysen nach syngener Transplantation - Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen

Mittels Durchflusszytometrie wurden an den Tagen -2, 19, 26, 33 und 61 Chimärismusanalysen durchgeführt. Anhand dieser Untersuchungen war es möglich zu differenzieren, ob die Zellen des Transplantats angewachsen waren und zu einer „neuen“ Hämatopoese geführt hatten, oder ob die vorhandenen Zellen im Blut (noch) vom Empfänger waren.

Da im syngen Transplantationsexperiment Spender- und Empfängerzellen nicht anhand des MHC-Moleküls unterschieden werden konnten (sowohl Spender (wildtyp C57Bl/6) als auch Empfänger (C57Bl/6-TTG) exprimieren das MHC H2D^b) (vgl. Abbildung 20), dienten die humanen Moleküle CD4 (huCD4) und Histocompatibility Locus A DR (HLA-DR) der C57Bl/6-TTG-Maus als Marker für Empfängerzellen (vgl. Abbildung 19), das murine CD4-Molekül hingegen war Marker für wildtyp C57Bl/6-Spenderzellen (Abbildung 21).

4.4.1.4.1 Humanes CD4⁺ und HLA-DR⁺ auf Empfängerzellen nach syngener Transplantation

Um festzustellen, ob nach Transplantation Spender- oder Empfängerzellen für die Regeneration der Hämatopoese verantwortlich sind, wurden die humanen Oberflächenmoleküle CD4 (Tag -2, 19, 26, 33 und 61) und HLA-DR (Tag -2, 26 und 61) als Marker für empfängereigene Zellen bestimmt. Nach syngener Transplantation nahm das humane CD4 bei allen Tieren ab. Bei einem Ausgangswert (Tag -2) von $36,30\% \pm 3,66\%$ in

der Versuchsgruppe bzw. $23,23\% \pm 3,30\%$ in der Kontrollgruppe, sanken die Werte bis zum Tag 61 auf $8,20\% \pm 7,52\%$ bzw. auf $4,18\% \pm 0,43\%$ (vgl. Abbildung 19 A und C). Das HLA-DR sank von $22,50\% \pm 6,73\%$ bei kotransplantierten Tieren bzw. $20,98\% \pm 4,05\%$ ohne T_{regs} -Behandlung an Tag -2 auf $0,18\% \pm 0,05\%$ bzw. $0,23\% \pm 0,05\%$ an Tag 61 (vgl. Abbildung 19 B und C).

Die Moleküle, die nur auf Empfängerzellen exprimiert werden, nehmen im Verlauf des Experiments ab. Damit ist gezeigt, dass die Empfängerzellen immer weniger werden und die endogene (empfängereigene) Hämatopoese nach der Bestrahlung nicht wiederkehrt.

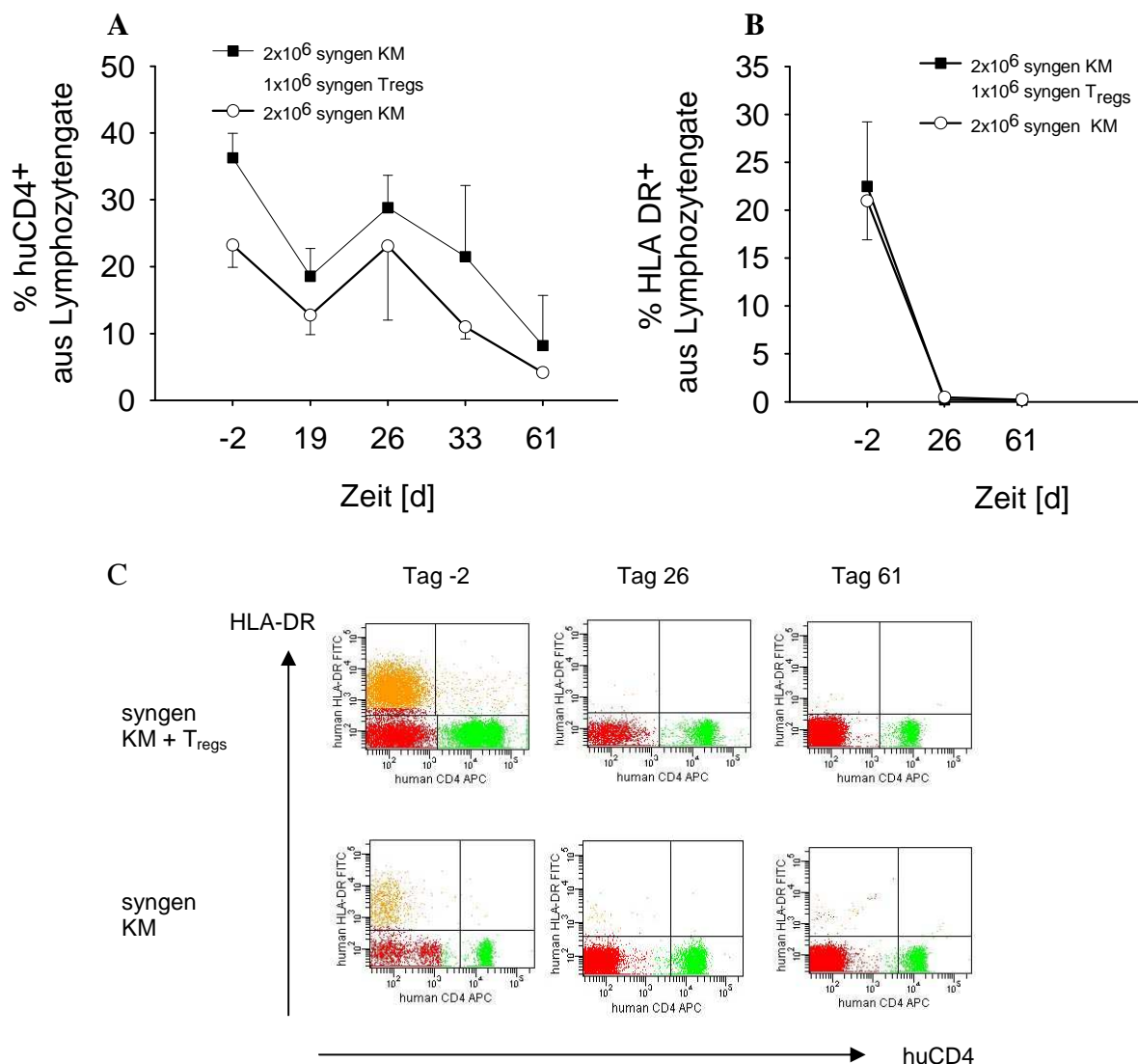


Abbildung 19: Expression von humanem CD4 ($huCD4^+$) und Histocompatibility Locus A DR (HLA-DR) auf Empfängerzellen nimmt nach sygener Transplantation im Verlauf des Experiments ab.

A Das humane CD4-Molekül (nur auf Empfängerzellen vorhanden) sank im Verlauf des Experiments bei einem Ausgangswert (Tag -2) von $36,30\% \pm 3,66\%$ in der Versuchsgruppe (2×10^6 Knochenmarkzellen (KM) mit T_{regs} -Kotransplantation) bzw. $23,23\% \pm 3,30\%$ in der Kontrollgruppe (2×10^6 KM) auf $8,20\% \pm 7,52\%$ bzw. auf $4,18\% \pm 0,43\%$ (Tag 61). **B** Das HLA-DR-Molekül (ebenfalls nur auf Empfängerzellen vorhanden) fiel von $22,50\% \pm 6,73\%$ bei kotransplantierten Tieren bzw. $20,98\% \pm 4,05\%$ ohne T_{regs} -Behandlung (Tag -2) auf $0,18\% \pm 0,05\%$ bzw. $0,23\% \pm 0,05\%$ (Tag 61). **C** Durchflusszytometrische Darstellung von humanem CD4 und HLA-DR auf Lymphozyten syngen transplantierte Tiere. Die grünen Punkte stellen $huCD4^+$ Lymphozyten dar, die orangenen $HLA-DR^+$ und die roten $huCD4^-$ und $HLA-DR^-$.

4.4.1.4.2 Murines H2D^b-MHC nach syngener Transplantation

Da im syngen Transplantationsmodell Spender und Empfänger dasselbe MHC-Protein exprimieren, ist eine Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen anhand dieses Moleküls nicht möglich. Diese Messung diente der Qualitätskontrolle, es war zu jedem Zeitpunkt des Experiments das MHC-Molekül des C57Bl/6-Mausstammes H2D^b durchflusszytometrisch nachweisbar. Nach Bestrahlung und Transplantation (Tag 0) fand ein leichter Abfall der Expression auf $96,15\% \pm 3,5\%$ bei der Versuchsgruppe bzw. $95,35\% \pm 2,96\%$ bei der Kontrollgruppe statt. Ab Tag 33 lagen die Werte für die MHC-Expression bei beiden Gruppen wieder über 98% (vgl. Abbildung 20 A und B).

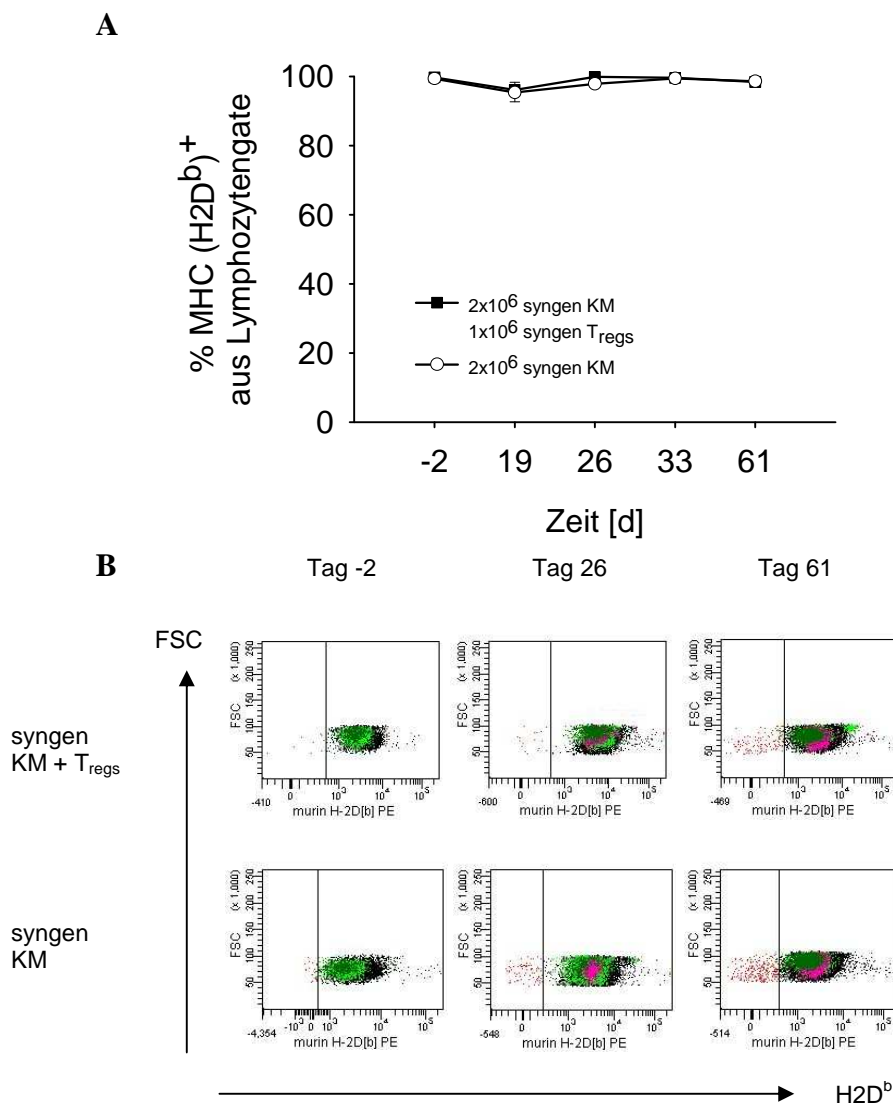


Abbildung 20: Murine MHC H2D^b-Expression nach syngener Transplantation.

A Das murine MHC H2D^b war zu jedem Zeitpunkt des Experiments auf Lymphozyten zu über 95% nachweisbar. Nach Bestrahlung und Transplantation (Tag 0) fand ein leichter Abfall der MHC-Expression sowohl in der Versuchs- (2×10^6 Knochenmarkszellen (KM) mit T_{regs}-Kotransplantation) als auch in der Kontrollgruppe (2×10^6 KM) statt ($96,15\% \pm 3,5\%$ bzw. $95,35\% \pm 2,96\%$). **B** Durchflusszytometrische Darstellung von murinem MHC H2D^b auf Lymphozyten syngen transplantierte Tiere. Alle bunten Punkte, die rechts der senkrechten Linie eines Bildes liegen, stellen MHC H2D^b⁺ Zellen dar, Punkte links der Linie sind MHC H2D^b⁻. FSC = Forward Scatter.

4.4.1.4.3 Murine CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach syngener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen

Da das murine CD4-Molekül (muCD4) nur auf Spenderzellen exprimiert wird, zeigt der Nachweis dieser Oberflächenstruktur, dass die transplantierten Zellen im Empfängerorganismus angewachsen sind und zu einer „neuen“ Hämatopoese geführt haben. Am Tag 19 nach syngener Transplantation konnte murines CD4 auf den T-Zellen der Empfängerermäuse nachgewiesen werden, d.h. die transplantierten Spenderzellen (wildtyp C57Bl/6) waren im Knochenmark angewachsen und hämatopoetisch aktiv.

In der Gruppe mit T_{regs}-Kotransplantation war der Anteil muriner CD3⁺CD4⁺ T-Zellen an Tag 19 des Experiments mit 11,35% ± 5,11% signifikant höher (P=0,007) als in der Kontrollgruppe (1,03% ± 0,86%). Ab Tag 33 bestand kein signifikanter Unterschied mehr zwischen Versuchs- und Kontrolltieren (vgl. Abbildung 21 A und B). Auch unter Berücksichtigung der Leukozytenzahl (WBC), zeigt die absolute Zahl muCD3⁺CD4⁺ Lymphozyten einen vergleichbaren Verlauf (Daten nicht gezeigt) mit signifikant mehr muCD3⁺CD4⁺ Lymphozyten in der Versuchsgruppen an den Tagen 19 und 26. Die zugrundeliegenden Mechanismen, die zu dem signifikanten Unterschied zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe in der Anzahl der muCD3⁺CD4⁺ Lymphozyten führen, gilt es zu erforschen. Der Einfluss bestimmter Zytokine und „Homing“-Faktoren muss untersucht werden.

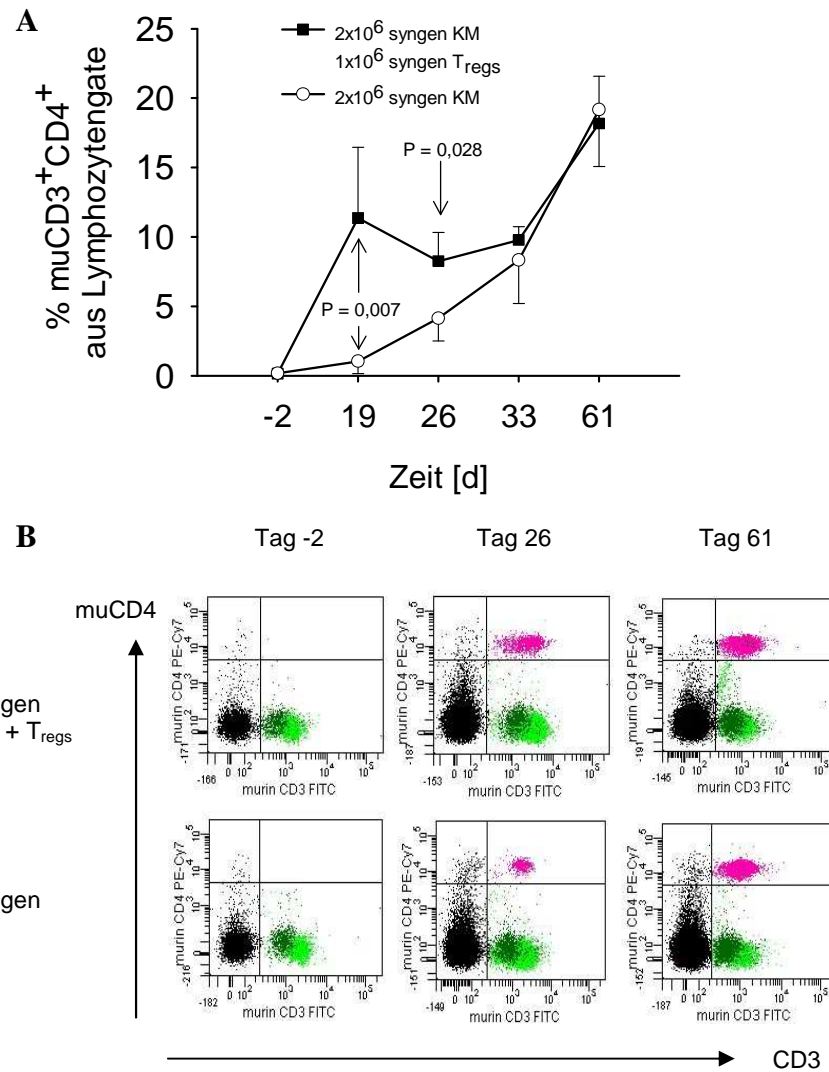


Abbildung 21: Murine CD3⁺CD4⁺-Expression nach syngener Transplantation.

A Die Expression von murinem CD4 (muCD4) auf den Empfängerlymphozyten spricht für das Anwachsen der transplantierten Spenderzellen. An Tag 19 ist die muCD4-Expression in der Versuchsgruppe (2×10^6 Knochenmarkzellen (KM) mit T_{regs}-Kotransplantation) mit $11,35\% \pm 5,11\%$ signifikant höher ($P=0,007$) als die der Kontrollgruppe (2×10^6 KM) ($1,03\% \pm 0,86\%$). Ab Tag 33 des Experiments besteht kein signifikanter Unterschied mehr zwischen den Gruppen. **B** Durchflusszytometrische Darstellung von murinem CD3 und CD4 auf Lymphozyten syngen transplantierte Tiere. Die rosanen Punkte stellen doppelt positive CD3⁺muCD4⁺ Lymphozyten (T-Helferzellen) dar, grüne Punkte sind CD3⁺ (andere T-Zellen) und schwarze Punkte sind CD3⁻ Zellen (z.B. B-Zellen).

4.4.1.4.4 Murine CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nach syngener Transplantation

CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen spielen bei der Pathogenese der Graft versus Host Disease als Effektorzellen eine zentrale Rolle. Aus diesem Grund wurde die Anzahl dieser Zellart im Verlauf des Experiments untersucht. Nach syngener Transplantation sank die Anzahl zytotoxischer T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) zunächst von 13,35% ± 1,74% (Tag -2) auf 6,45% ± 3,33% (Tag 19) mit bzw. von 12,43% ± 2,46% (Tag -2) auf 4,48% ± 2,07% (Tag 19) ohne T_{regs}-Kotransplantation. Bis zum Experimentende stieg die Anzahl auf 8,98% ± 3,09% bei kotransplantierten Tieren bzw. 6,28% ± 0,77% (vgl. Abbildung 22 A und B).

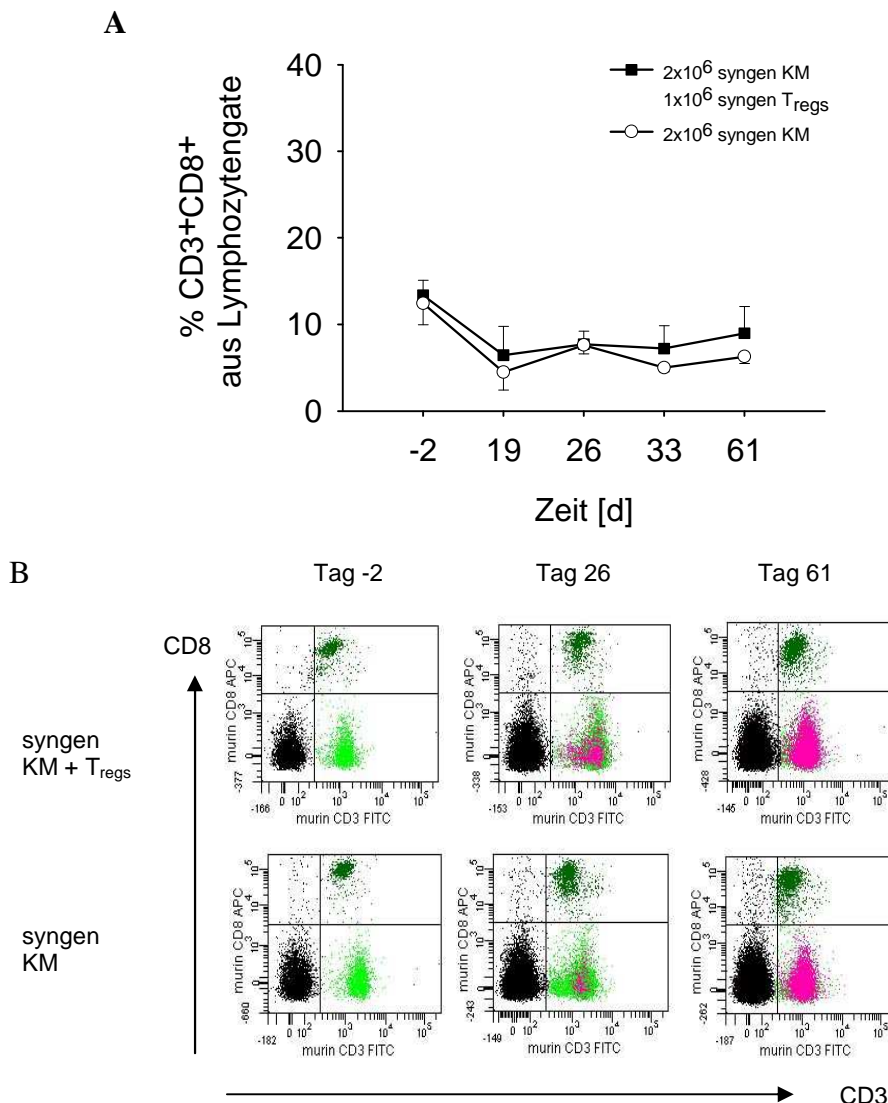


Abbildung 22: Murine CD3⁺CD8⁺-Expression nach syngener Transplantation.

A Die Anzahl zytotoxischer T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) sank nach Transplantation bis Tag 19 in beiden Gruppen (von 13,35% ± 1,74% (Tag -2) auf 6,45% ± 3,33% (Tag 19) in der Versuchsgruppe (2x10⁶ Knochenmarkzellen (KM) mit T_{regs}-Kotransplantation) bzw. von 12,43% ± 2,46% (Tag -2) auf 4,48% ± 2,07% (Tag 19) in der Kontrollgruppe (2x10⁶ KM)). Bis zum Experimentende stieg die Zahl wieder leicht an (auf 8,98% ± 3,09% bei kotransplantierten Tieren bzw. 6,28% ± 0,77%). **B** Durchflusszytometrische Darstellung von murinem CD3 und CD8 auf Lymphozyten syngen transplantierte Tiere. Die dunkelgrünen Punkte stellen doppelt positive CD3⁺CD8⁺ Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) dar, hellgrüne und rosane Punkte repräsentieren CD3⁺ Zellen (andere T-Zellen) und schwarze Punkte sind CD3⁻ Zellen (z.B. B-Zellen).

4.4.1.4.5 $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Spender- T_{regs}) und $CD3^+CD4^-CD25^+FoxP3^+$ (Empfänger- T_{regs}) T-Zellen nach syngener Transplantation

Im Verlauf des Experiments wurde an den Tagen -2, 19, 26, 33 und 61 die Anzahl an $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Spender- T_{regs}) und $CD3^+CD4^-CD25^+FoxP3^+$ (Empfänger- T_{regs}) T-Zellen durchflusszytometrisch bestimmt.

Die Gesamtzahl an T_{regs} ($CD3^+CD25^+FoxP3^+$ (* $CD3^+$ Zellen sind $\mu CD4^+$ und $\mu CD4^-$)) nach syngener Transplantation verhält sich in Versuchs- und Kontrollgruppe unterschiedlich: Während sich in der Versuchsgruppe die Gesamtzahl an T_{regs} zunächst verringert (bis Tag 19), nimmt die Anzahl dieser Zellen bei der Kontrollgruppe kontinuierlich zu (vgl. Abbildung 23). Die Anzahl an Spender- T_{regs} ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) verhält sich in beiden Gruppen ähnlich, allerdings ist der Anstieg der Spender- T_{regs} -Zahl in der Versuchsgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich steiler. In der T_{regs} -kotransplantierten Versuchsgruppe waren am Tag 19 signifikant ($P=0,004$) mehr $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen messbar ($0,29\% \pm 0,11\%$ bei T_{regs} -Kotransplantation, $0,05\% \pm 0,01\%$ bei reiner Knochenmarktransplantation) (vgl. Abbildung 24 A und B).

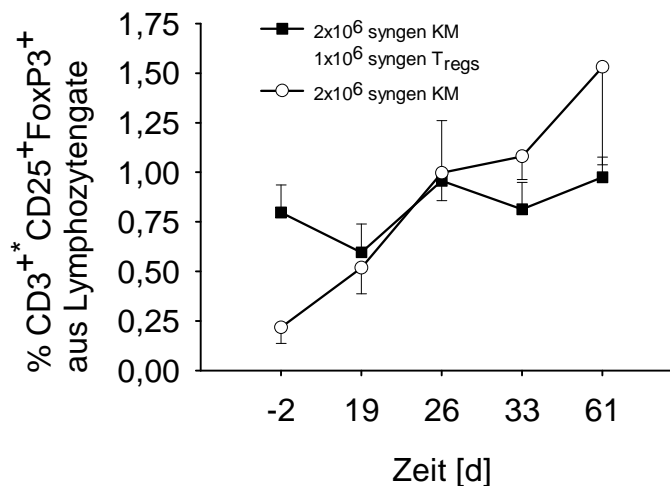


Abbildung 23: Gesamtzahl regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) ($CD3^+CD25^+FoxP3^+$) nach syngener Transplantation.

Die Anzahl regulatorischer T-Zellen nahm in der Versuchsgruppe (2×10^6 Knochenmarkzellen (KM) mit T_{regs} -Kotransplantation) zunächst ab, während sie in der Kontrollgruppe (2×10^6 KM) bis Tag 26 kontinuierlich anstieg.

* $CD3^+$ Zellen sind $\mu CD4^+$ und $\mu CD4^-$.

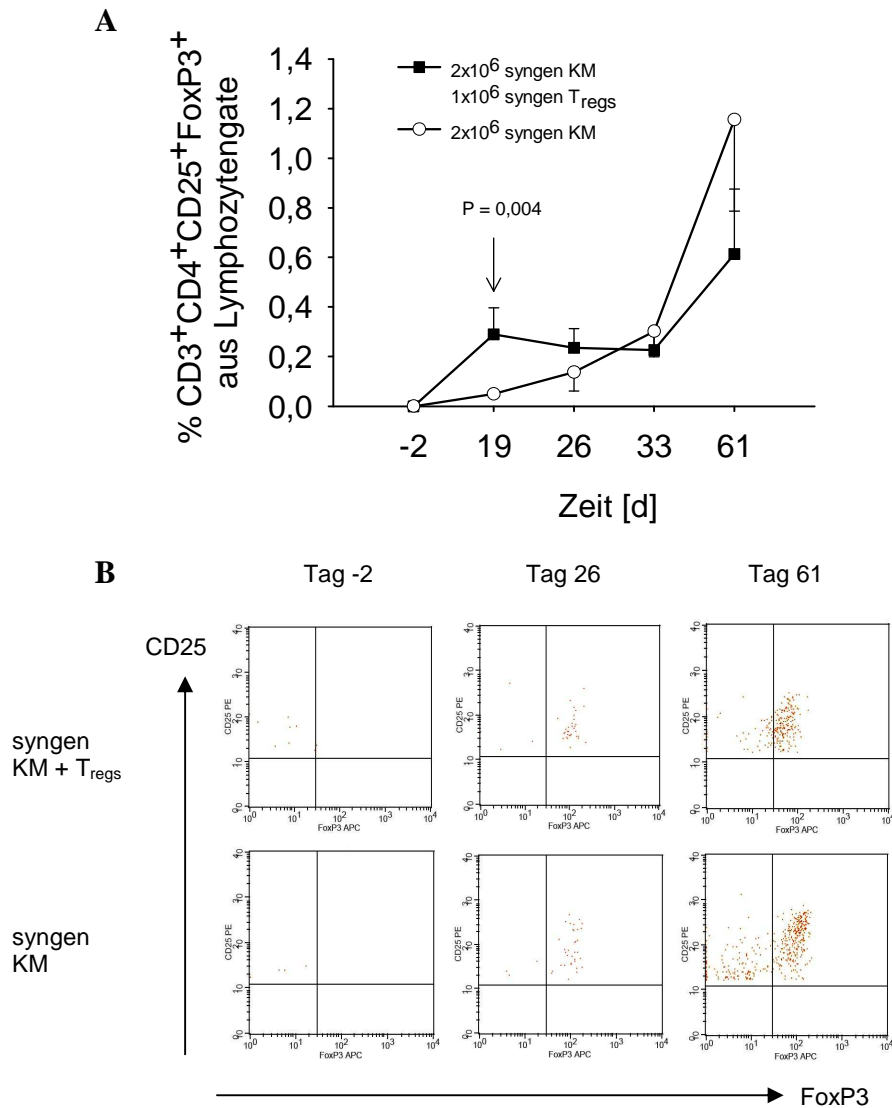


Abbildung 24: Spender-T_{regs} (CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺) nach syngener Transplantation.

A Die Anzahl an Spender-T_{regs} stieg in beiden Gruppen nach Transplantation an. An Tag 19 waren in der Versuchsgruppe (2x10⁶ Knochenmarkzellen (KM) mit T_{regs}-Kotransplantation) signifikant mehr (P=0,004) Spender-T_{regs} vorhanden. **B** Durchflusszytometrische Darstellung von FoxP3 und CD25 auf CD3⁺CD4⁺ T-Lymphozyten syngen transplantierte Tiere. Die roten Punkte im rechten oberen Quadranten jedes Bildes sind spendereigene CD3⁺CD4⁺CD25⁺FoxP3⁺ T-Zellen (Spender-T_{regs}).

4.4.1.5 Histologie des Knochenmarks nach syngener Transplantation

Am Ende des Experiments (Tag 61 nach Transplantation) wurden die Hinterbeine der Tiere präpariert und für die histologische Untersuchung aufbereitet. Um die vorher ermittelten Parameter (WBC-Messung, durchflusszytometrische Untersuchungen) *in situ* zu beurteilen, bzw. die Ergebnisse zu veranschaulichen, wurden histologische Schnitte der Hintergliedmaßen angefertigt und lichtmikroskopisch ausgewertet (vgl. Abbildung 25 A, B und C). Bei den Bestrahlungskontrolltieren, die im Verlauf des Versuchs verstorben waren, waren keine blutbildenden Zellen im Knochenmark des Oberschenkels nachweisbar (vgl. Abbildung 25 C). Die syngen transplantierten Tiere aus Versuchs- (2x10⁶ Knochenmarkzellen

mit T_{regs}-Kotransplantation) und Kontrollgruppe (2×10^6 Knochenmarkzellen) wiesen eine mit zahlreichen Zellen gefüllte Markhöhle auf (vgl. Abbildung 25 A und B).

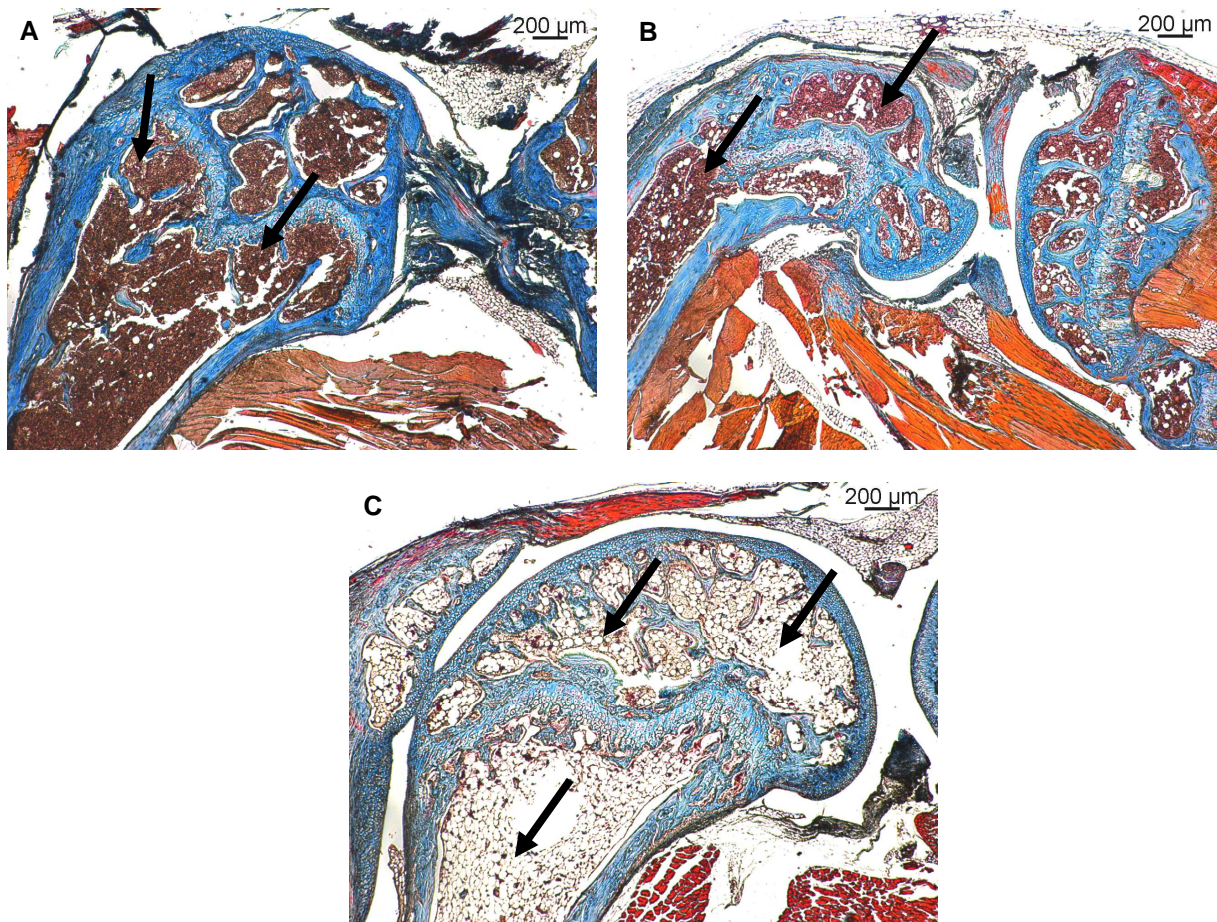


Abbildung 25: Lichtmikroskopische Darstellung histologischer Schnitte vom Knochenmark im Epikondylus des Femurknochens nach syngener Transplantation.

A Hinterbein einer nach Konditionierung (Ganzkörperbestrahlung) syngen mit 2×10^6 Knochenmarkzellen und 1×10^6 T_{regs} transplantierten Maus. Die Knochenhöhle ist mit hämatopoetisch aktiven Zellen gefüllt, womit gezeigt ist, dass die Spenderzellen angewachsen sind und zu einer „neuen“ Hämatopoese geführt haben. **B** Hinterbein einer Maus, die nach Konditionierung syngen mit 2×10^6 Knochenmarkzellen transplantiert wurde. Hier ist ebenfalls hämatopoetisch aktives Knochenmark zu finden. **C** Hinterbein einer Maus, die bestrahlt wurde, jedoch keine Zellen transplantiert bekam (Bestrahlungskontrollgruppe mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelt).

4.4.2 Allogene Transplantation von Knochenmarkzellen, Milzzellen und T_{regs}-

Kotransplantation in dreifach transgene Empfängertiere

Die allogenen Transplantationsexperimente wurden im Anschluss an die syngenesischen Versuche durchgeführt, um die klinische Translation zu ermöglichen (wo es ja insbesondere um allogene Transplantationen geht). Zunächst wurde die allogene Transplantation unter gleichen Bedingungen wie die syngene durchgeführt (TX-Exp 2). Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse musste die allogene Transplantation jedoch optimiert werden (TX-Exp 3 bis 5), indem die Zellzahl im Transplantat erhöht wurde und zusätzlich Milzzellen hinzugegeben wurden (vgl. Abbildung 4 und Tabelle 1).

4.4.2.1 Überleben dreifach transgener Mäuse nach allogener Transplantation von Knochenmarkzellen und Milzzellen mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation

Im ersten allogenen Transplantationsexperiment (TX-Exp 2) wurden bestrahlte, dreifach transgene Empfängertiere allogenen mit 2×10^6 Knochenmark und 1×10^6 CD4⁺CD25⁺ T-Zellen (Versuchsgruppe) bzw. 2×10^6 Knochenmark (Kontrollgruppe) behandelt. Als Bestrahlungskontrolle dienten bestrahlte, mit 0,9%iger Natriumchloridlösung behandelte Tiere. Von den allogenen transplantierten Tieren aus TX-Exp 2 verstarben alle Tiere bis Tag 28 (vgl. Abbildung 26 A).

Im anschließenden Experiment (TX-Exp 3) wurde eine Kontrollgruppe allogenen mit 1×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen transplantiert, von denen 25% bis zum Versuchsende am Tag 61 überlebten (vgl. Abbildung 26 B).

In einem weiteren Versuch (TX-Exp 4) wurde eine Kontrollgruppe allogenen mit 3×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen behandelt. Von diesen Tieren überlebten 50% bis zum Ende des Experiments (vgl. Abbildung 26 B).

In TX-Exp 5 wurde die Kontrollgruppe aus TX-Exp 4 wiederholt und eine Versuchsgruppe allogenen mit 3×10^7 Knochenmark, 5×10^6 Milzzellen und $1,5 \times 10^6$ CD4⁺CD25⁺ T-Zellen transplantiert. In der Kontrollgruppe überlebten wieder 50% der Tiere, in der Versuchsgruppe verstarben alle Tiere bis Tag 19 (vergleichbar mit der Bestrahlungskontrolle) (vgl. Abbildung 26 C).

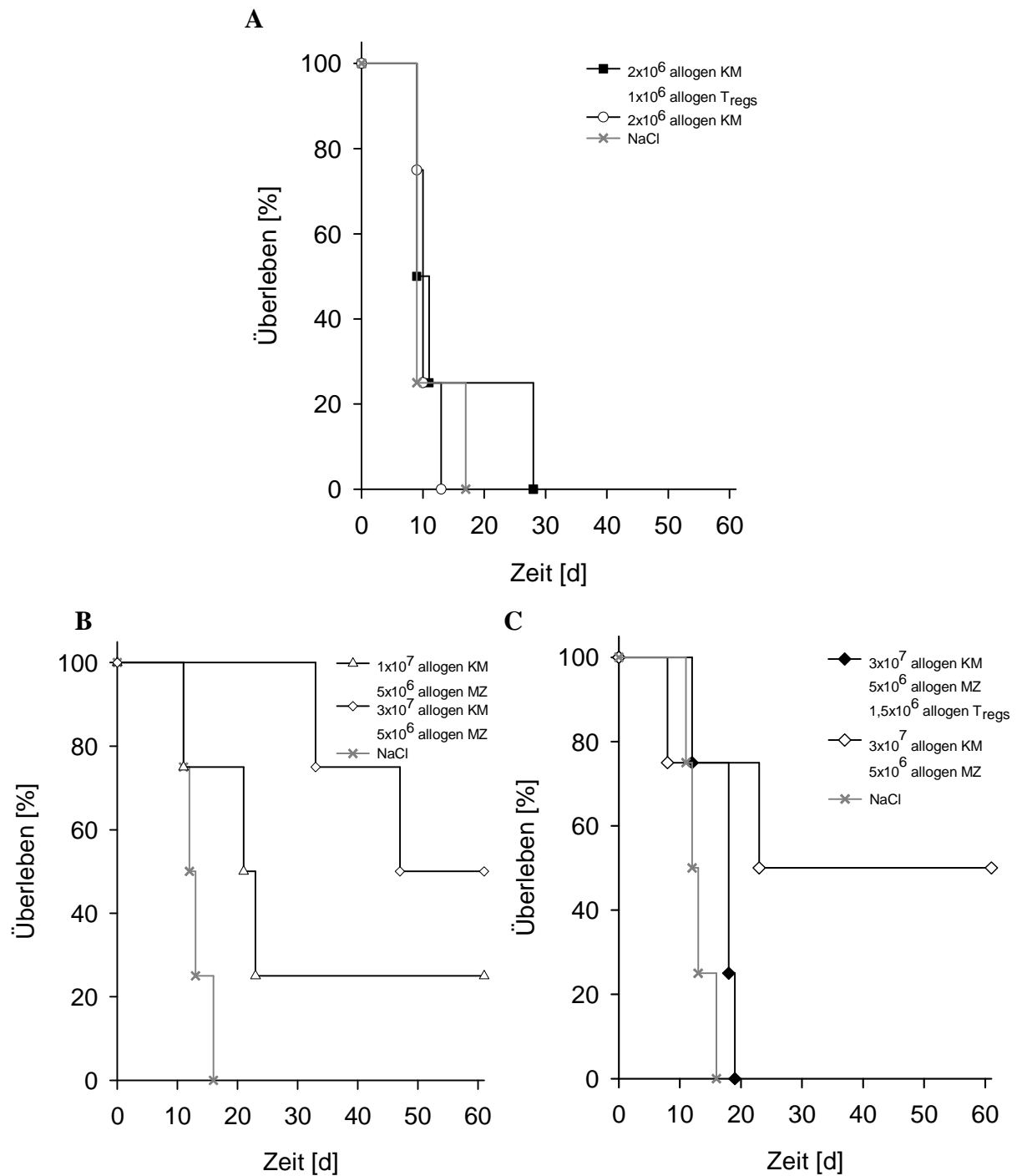


Abbildung 26: Überleben dreifach transgener C57Bl/6-TTG-Empfängermäuse nach allogener Transplantation. **A** Nach Transplantation von 2x10⁶ Knochenmarkszellen (KM) mit bzw. ohne T_{regs}-Kotransplantation (TX-Exp 2) verstarben alle Gruppen (Versuchs-, Kontroll- und Bestrahlungskontrollgruppe) bis Tag 28. **B** Nach Transplantation von 1x10⁷ KM und 5x10⁶ Milzzellen (MZ) (TX-Exp 3) überlebten 25% der Tiere bis zum Experimentende; Transplantation von 3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ (TX-Exp 4) führte zum Überleben von 50% der Tiere. **C** Durch Wiederholung der Gruppe 3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ (TX-Exp 5) konnte das Ergebnis von 50% Überleben reproduziert werden. Die Versuchsgruppe aus TX-Exp 5 (3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ mit 1,5x10⁶ T_{regs}-Kotransplantation) verstarb bis Tag 19 des Experiments.

4.4.2.2 Gewichtsverlauf nach allogener Transplantation

Nach allogener Transplantation zeigte sich bei allen Tieren, der auch in den syngenem Experimenten beobachtete initiale Gewichtsverlust nach der Bestrahlung. Die überlebenden Tiere der allogenen Transplantationsversuche erholten sich jedoch und nahmen bis zum Experimentende wieder an Gewicht zu (vgl. Abbildung 27 B, C und D). Die vorzeitig verstorbenen Mäuse nahmen nach anfänglichem Gewichtsverlust weiter bis zu ihrem Tod ab (vgl. Abbildung 27 A, B, C und D).

Auch die relative Darstellung des Gewichts in % des Ausgangsgewichts ergab ein vergleichbares Bild (Daten nicht gezeigt).

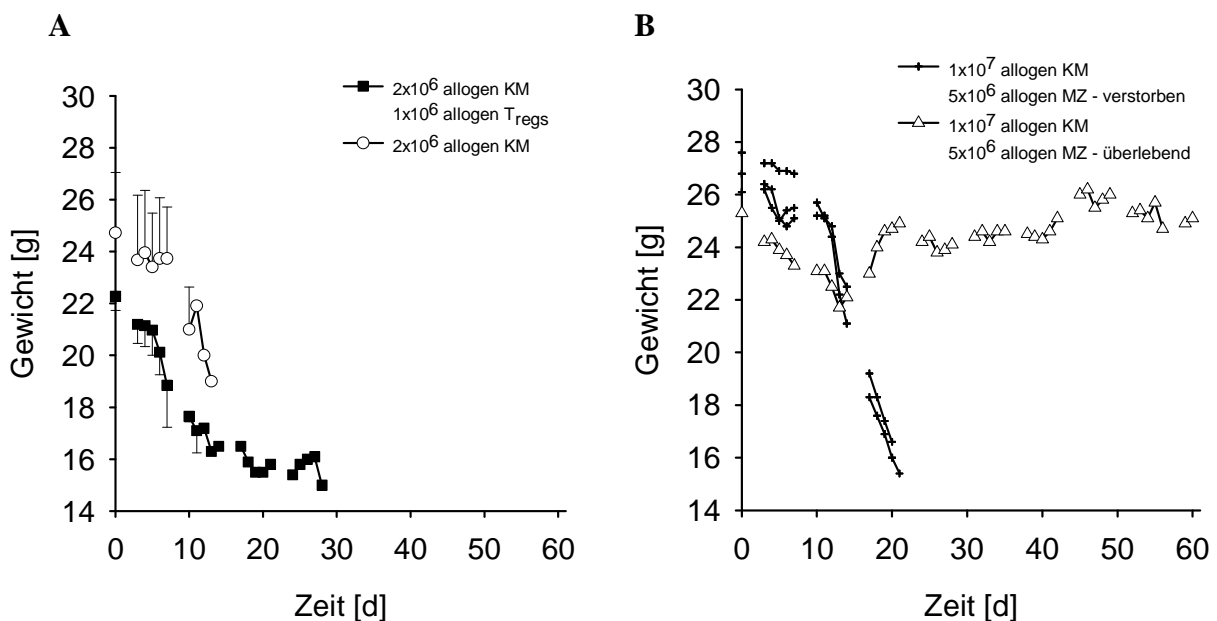


Abbildung 27: Gewichtsverlauf nach allogener Transplantation.

A Alle Tiere des Transplantationsexperiments 2 (TX-Exp2) (2x10⁶ Knochenmark (KM) mit bzw. ohne 1x10⁶ T_{regs}-Kotransplantation) verloren bis zu ihrem Tod an Gewicht. **B** Im TX-Exp 3 (1x10⁷ KM und 5x10⁶ Milzzellen (MZ)) nahmen die vorzeitig verstorbenen Tiere bis zu ihrem Tod kontinuierlich ab. Die überlebende Maus nahm nach anfänglichem Gewichtsverlust ab Tag 13 wieder zu.

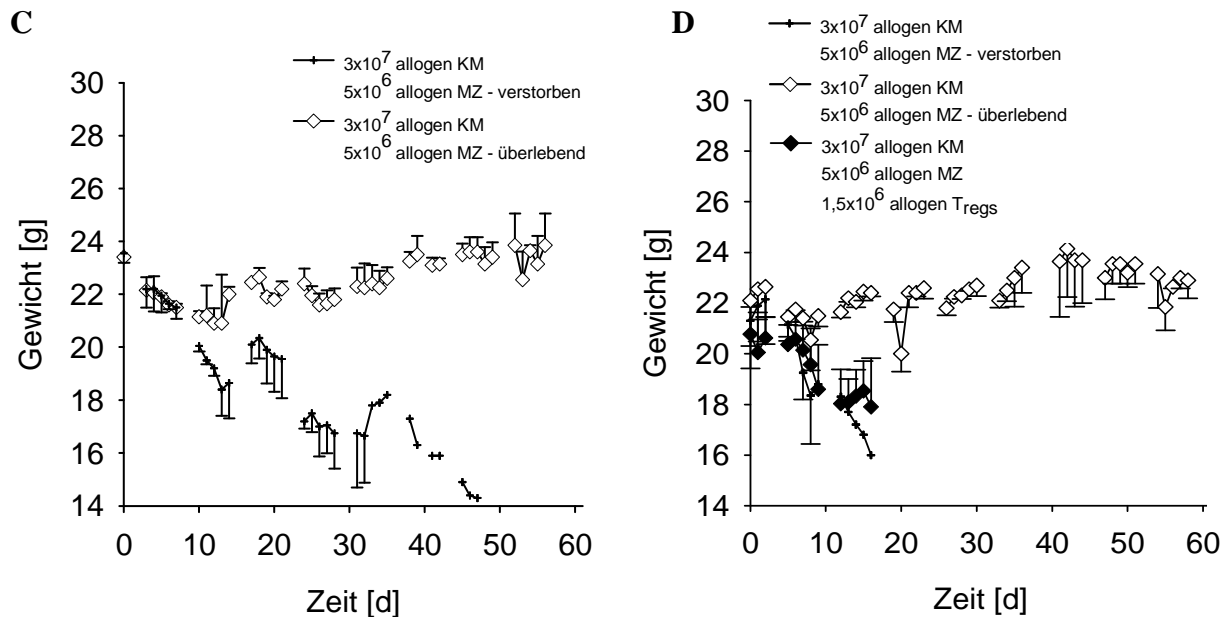


Abbildung 27: Gewichtsverlauf nach allogener Transplantation.

C Die vorzeitig verstorbenen Tiere aus TX-Exp 4 (3×10^7 KM und 5×10^6 MZ) verloren bis zu ihrem Tod stetig an Gewicht. Die überlebenden Mäuse nahmen bis zum Experimentende zu. **D** Sowohl die vorzeitig verstorbenen Tiere der Kontrollgruppe (3×10^7 KM und 5×10^6 MZ), als auch die gesamte Versuchsgruppe (3×10^7 KM und 5×10^6 MZ mit $1,5 \times 10^6$ T_{regs}-Kotransplantation) nahmen bis zum Tod an Körpermasse ab. Die überlebenden Tiere der Kontrollgruppe wurden zum Experimentende immer schwerer.

4.4.2.3 Leukozytenzahl im Blut (WBC) und Differentialblutbild nach allogener Transplantation

Bei allen frühzeitig verstorbenen Tieren aus den allogenen Transplantationsexperimenten (TX-Exp 2 bis 5) fielen die Leukozytenwerte nach der Bestrahlung bis zum Tod auf unter $1 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Abbildung 28 A bis D). Es war kein Differentialblutbild erstellbar.

Das überlebende Tier aus TX-Exp 3 (1×10^7 allogen KM und 5×10^6 allogen MZ) hatte bis Tag 12 ebenfalls sinkende Leukozytenwerte, erholte sich jedoch dann bis zum Ende des Versuchs mit einem Einknick an Tag 33 (Abbildung 28 B).

Nach allogener Transplantation von 3×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen fielen bei allen Tieren (TX-Exp 4 und 5) nach Bestrahlung die Leukozytenzahlen. Bei den überlebenden Mäusen der Kontrollgruppen stiegen die Werte ab Tag 12 wieder an, bei den frühzeitig verstorbenen blieben die Werte bis zum Tod unter $5 \times 10^3/\text{mm}^3$ (Abbildung 28 C, D).

Nach allogener Transplantation von 3×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen mit T_{regs}-Kotransplantation (TX-Exp 5) sanken die Leukozytenzahlen nach Bestrahlung und stiegen bis zum Versterben nicht wieder an (Abbildung 28 D).

Im Differentialblutbild zeigte sich bei den überlebenden Tieren aus TX-Exp 3, 4 und 5, wie auch nach syngener Transplantation beobachtet (vgl. Abbildung 18), zum Zeitpunkt der

Leukozytopenie eine relative Granulo- und Monozytose, die mit Wiederanstieg der Leukozytenzahlen verschwand (Abbildungen 29 und 30).

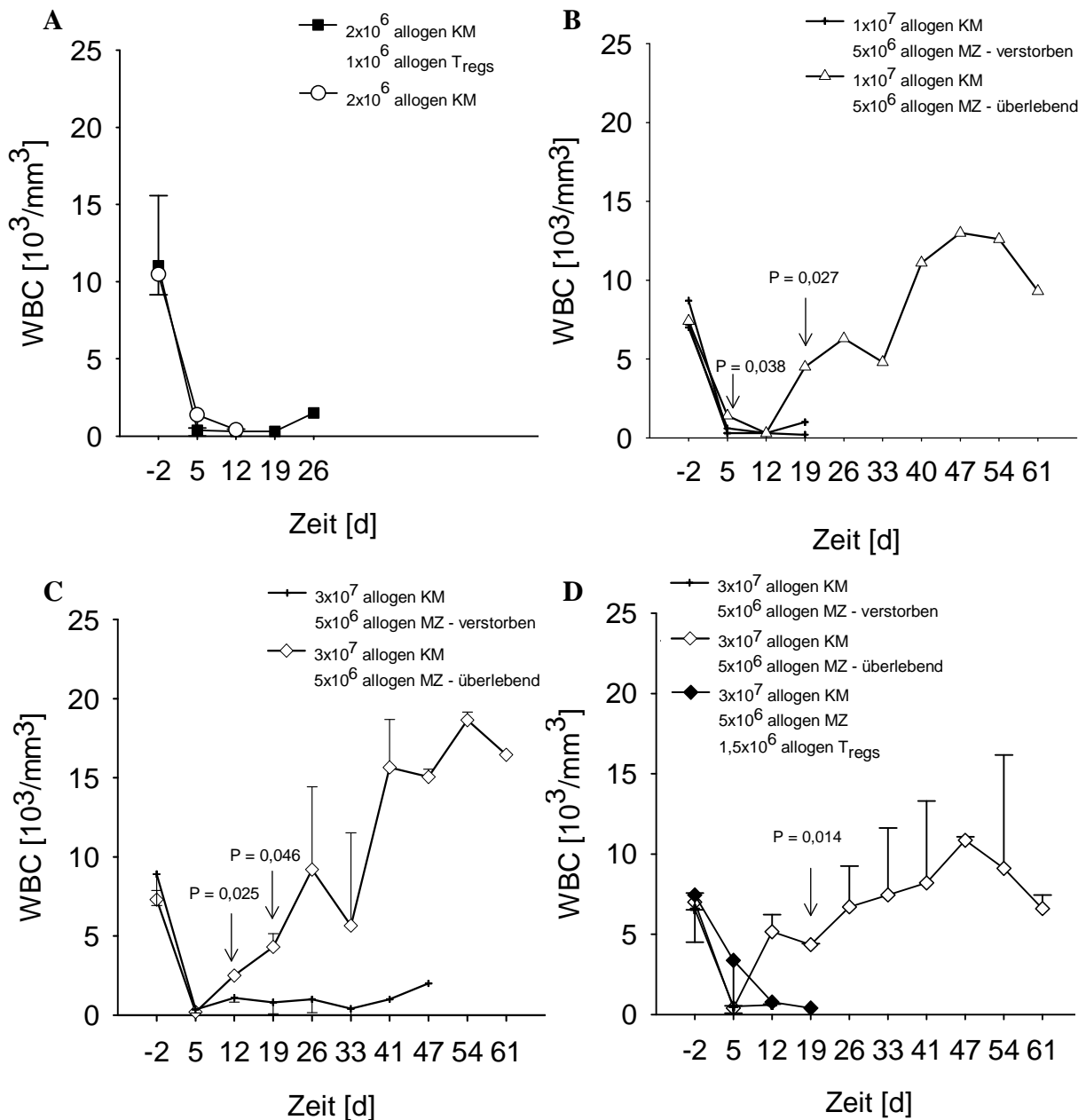


Abbildung 28: Verlauf der weißen Blutzellen (WBC) nach allogener Transplantation.

A Bei allen Tieren des Transplantationsexperiments 2 (TX-Exp2) (2x10⁶ Knochenmark (KM) mit bzw. ohne 1x10⁶ T_{regs}-Kotransplantation) fielen die Leukozytenwerte bis zum vorzeitigen Versterben auf Werte unter 1x10³/mm³. **B** Im TX-Exp 3 (1x10⁷ KM und 5x10⁶ Milzzellen (MZ)) sanken die Leukozytenwerte bei den vorzeitig verstorbenen Tieren bis zu ihrem Tod kontinuierlich ab. Die überlebende Maus hatte bis Tag 12 sinkende Werte, die sich bis zum Experimentende wieder erholten. **C** Die vorzeitig verstorbenen Tiere aus TX-Exp 4 (3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ) erholten sich bis zu ihrem Tod nicht von der konditionierungsbedingten Leukozytopenie. Die überlebenden Mäuse zeigten ab Tag 12 steigende Leukozytenwerte. **D** Der WBC der vorzeitig verstorbenen Tiere der Kontrollgruppe (3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ) und der gesamten Versuchsgruppe (3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ mit 1,5x10⁶ T_{regs}-Kotransplantation) sank bis zum Tod auf Werte unter 1x10³/mm³. Die überlebenden Tiere der Kontrollgruppe zeigten ab Tag 12 wieder steigende Werte.

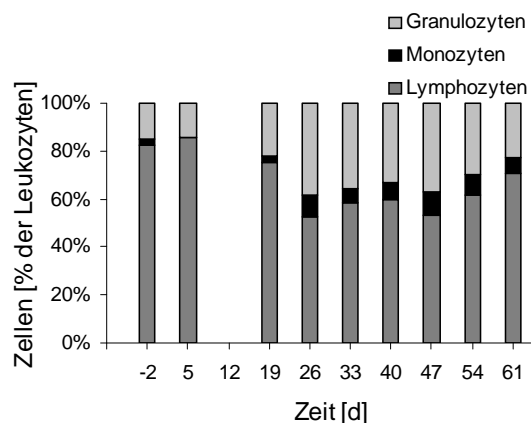


Abbildung 29: Differentialblutbild des überlebenden Tieres nach allogener Transplantation von 1×10^7 Knochenmark- und 5×10^6 Milzzellen.
An Tag 12 konnte kein Differentialblutbild erstellt werden, da der Leukozytenwert unter $1 \times 10^3/\text{mm}^3$ lag.

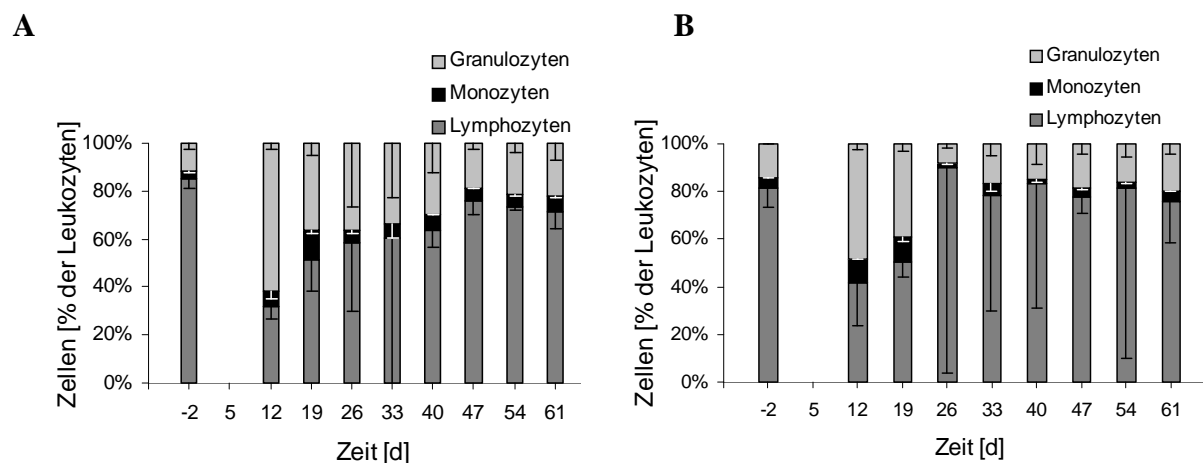


Abbildung 30: Differentialblutbild überlebender Tiere nach allogener Transplantation von 3×10^7 Knochenmark- und 5×10^6 Milzzellen (**A** Gruppe aus TX-Exp 4 und **B** Kontrollgruppe aus TX-Exp 5).
Während der bestrahlungsbedingten Leukozytopenie (Tage 5 bis 19) (vgl. Abbildungen 28 C und D) konnte, wie auch nach syngener Transplantation eine relative Granulo- und Monozytose beobachtet werden, die mit Wiederanstieg der Leukozytenzahlen verschwand. Am Tag 5 konnte kein Differentialblutbild erstellt werden, da die Leukozytenwerte unter $1 \times 10^3/\text{mm}^3$ lagen.

4.4.2.4 Chimärismusanalysen nach allogener Transplantation - Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen

Mittels Durchflusszytometrie wurden an den Tagen -2, 19, 26, 33 und 61 Chimärismusanalysen durchgeführt. Die Untersuchung der Blutzellen auf spendereigene Oberflächenmoleküle ermöglicht es eine Aussage über das Schicksal des Transplantats zu treffen. Sind spendereigene Moleküle auf den Zellen des Empfängers nachzuweisen, spricht das für die Akzeptanz des Transplantats.

Im allogenen Transplantationsmodell können Spender- von Empfängerzellen anhand des MHC-Moleküls differenziert werden. Spenderzellen (aus wildtyp Balb/c-Mäusen) exprimieren das MHC H2K^d, während Empfängerzellen (C57Bl/6-TTG-Mäuse) vor der Behandlung (Bestrahlung und Transplantation) das MHC H2D^b besitzen.

In dem allogenen Modell mit der dreifach transgenen Maus als Empfängertier stehen, wie auch im syngenem Modell, ebenfalls die humanen Oberflächenmoleküle CD4 (huCD4) und Histocompatibility Locus A DR (HLA-DR) als Chimärismusmarker zur Verfügung. Diese Strukturen sind nur auf Empfängerzellen nachweisbar.

Nachfolgend sind die Ergebnisse des letzten Transplantationsexperiments (TX-Exp 5) graphisch dargestellt. Alle vorzeitig verstorbenen Tiere aus den vorangegangenen Versuchen verhielten sich analog zu den gezeigten Verstorbenen, die überlebenden Tiere aus TX-Exp 3 und 4 (1×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen; 3×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen) zeigten vergleichbare Verläufe zu der abgebildeten Überlebenden.

4.4.2.4.1 Humanes CD4⁺ und HLA-DR⁺ auf Empfängerzellen nach allogener Transplantation

Die humanen Oberflächenproteine CD4 und HLA-DR wurden bestimmt, um das Schicksal der Empfängerzellen zu untersuchen. Die beiden Marker sind nur auf empfangereigenen Lymphozyten zu finden.

Die vorzeitig verstorbenen Tiere aus TX-Exp 2 konnten lediglich bis Tag 26 untersucht werden. Das humane CD4 lag am Tag -2 bei 19%, stieg auf 34% (Tag 19) und sank auf 4% (Tag 26). Die vorzeitig verstorbenen Tiere aus den folgenden allogenen Transplantationsexperimenten (TX-Exp 3: 1×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen; TX-Exp 4: 3×10^7 Knochenmark und 5×10^6 Milzzellen; TX-Exp 5: 3×10^7 Knochenmark, 5×10^6 Milzzellen und $1,5 \times 10^6$ T_{regs}) zeigten das humane CD4 betreffend ein einheitliches Bild: Anstieg bzw. kein Abfall der humanen CD4⁺-Expression bis zu ihrem Versterben. An Tag 19 lagen die Werte mit 28,14% und 21,73% (TX-Exp 3) bzw. $23,21\% \pm 6,00\%$ (TX-Exp 4)

deutlich (n.s.) über dem der überlebenden Maus mit 2,51% (TX-Exp 3) bzw. $0,54\% \pm 0,48\%$ (TX-Exp 4) und $0,66\% \pm 0,62\%$ (TX-Exp 5) (vgl. Abbildung 31 A und C). Bei den überlebenden Tieren aus TX-Exp 3, 4 und 5 verhielt sich das humane CD4 genauso wie nach syngener Transplantation (vgl. Abbildung 19): In TX-Exp 3 sank das humane CD4⁺ von 21,74% (Tag -2) auf 0,02% (Tag 61), in TX-Exp 4 fielen die Werte von $24,34\% \pm 2,64\%$ auf $0,04\% \pm 0,00\%$ und in TX-Exp 5 von $25,96\% \pm 0,70\%$ (Tag -2) auf $0,04\% \pm 0,03\%$ (Tag 61) (vgl. Abbildung 31 A und C).

Der zweite humane Marker, das HLA-DR, nahm sowohl bei vorzeitig verstorbenen als auch bei überlebenden Tieren nach der Bestrahlung ab. Die Werte fielen im TX-Exp 2 von 20% (Tag -2) auf unter 2% (Tag 26); im TX-Exp 3 von $21,65\% \pm 0,97\%$ (Tag -2) auf 0,1% (Tag 26); im TX-Exp 4 von $37,00\% \pm 7,63\%$ (Tag -2) auf $0,98\% \pm 0,43\%$ (Tag 26) und im TX-Exp 5 von $23,46\% \pm 2,76\%$ (Tag -2) auf $0,22\% \pm 0,03\%$ (Tag 26) (vgl. Abbildung 31 B und C). (Die angegebenen Werte sind Mittelwerte der gesamten Gruppe, d.h. vorzeitig verstorbene Tiere und Überlebende einer Gruppe wurden zusammengefasst).

Die Bestimmung der humanen Oberflächenproteine zeigte, dass die Empfängerzellen im Verlauf des Experiments verschwanden, die endogene (empfängereigenen) Hämatopoese also nach der Bestrahlung nicht wiederkehrt.

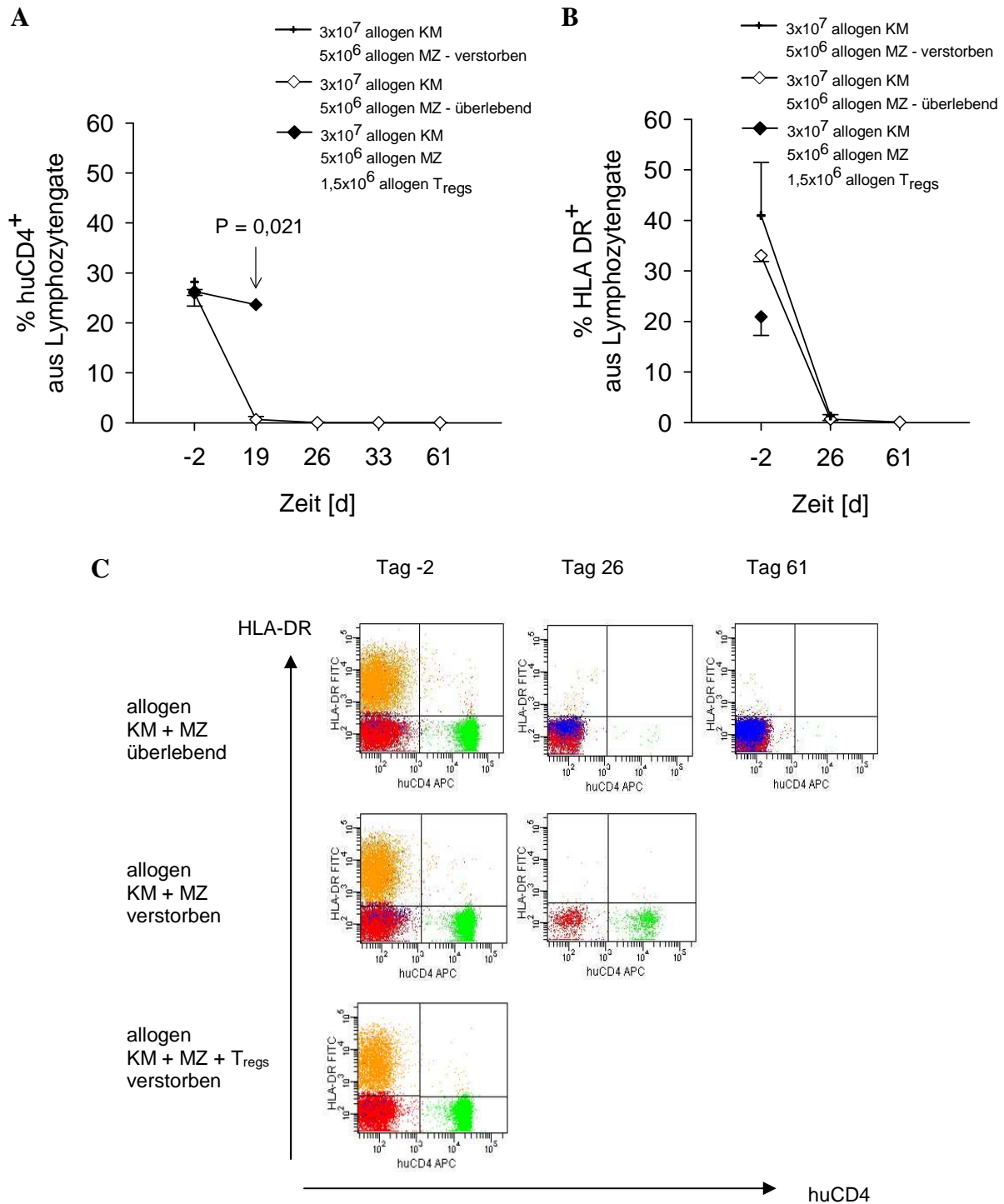


Abbildung 31: Expression von humanem CD4 (huCD4) und Histocompatibility Locus A DR (HLA-DR) auf Empfängerzellen nimmt bei überlebenden Tieren nach allogener Transplantation im Verlauf des Experiments ab. **A** Das humane CD4-Molekül (nur auf Empfängerzellen vorhanden) sank im Verlauf des Experiments bei den überlebenden Tieren der Kontrollgruppe (3×10^7 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^6 Milzzellen (MZ)) von $25,96\% \pm 0,70\%$ (Tag -2) auf $0,04\% \pm 0,03\%$ (Tag 61). Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Kontrollgruppe bzw. der Versuchsgruppe fiel der huCD4-Wert nicht bzw. die Tiere verstarben vor der zweiten Messung. **B** Das HLA-DR-Molekül (ebenfalls nur auf Empfängerzellen vorhanden) fiel sowohl bei den überlebenden Tieren von $33,05\% \pm 1,20\%$ (Tag -2) auf $0,65\% \pm 0,21\%$ (Tag 26), als auch bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Kontrollgruppe von $40,95\% \pm 10,54\%$ (Tag -2) auf $1,30\% \pm 0,28\%$ (Tag 26). Die Versuchsgruppe verstarb vor der zweiten Messung. **C** Durchflusszytometrische Darstellung von huCD4 und HLA-DR auf Lymphozyten allogener transplantierte Tiere. Die grünen Punkte stellen huCD4^+ Lymphozyten dar, die orangenen HLA-DR^+ und die roten huCD4^- und HLA-DR^- .

4.4.2.4.2 Murines H2K^d-MHC nach allogener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen

Um die Akzeptanz des Transplantats nach allogener Transplantation von Balb/c-Zellen in C57Bl/6-TTG-Tiere (H2D^b) zu ermitteln, wurde die Expression des MHC-Moleküls des Balb/c-Mausstammes H2K^d (Spender) untersucht. Vor der Bestrahlung und der Transplantation war das H2K^d-Molekül nicht auf den Zellen der Empfängermäuse nachzuweisen ($0,95\% \pm 0,34\%$) (vgl. Abbildung 32 A und B).

Bei allen frühzeitig verstorbenen Mäusen nach allogener Transplantation (TX-Exp 2 bis 5) war am Tag 19 nur eine geringe Expression von Balb/c-MHC messbar. Weniger als 50% aller Lymphozyten waren H2K^{d+} (vgl. Abbildung 32 A und B). Bei den überlebenden Mäusen aus TX-Exp 3, 4 und 5 war bereits am Tag 19 eine H2K^d-Expression von über 50% auf den Lymphozyten nachweisbar, die bis zum Versuchsende annähernd 100% erreichte (vgl. Abbildung 32 A und B).

Der Nachweis des Spender-MHCs H2K^d auf nahezu allen Lymphozyten der überlebenden Tiere zeigt, dass die Spenderzellen im Knochenmark der dreifach transgenen Empfängertiere angewachsen und hämatopoetisch aktiv sind.

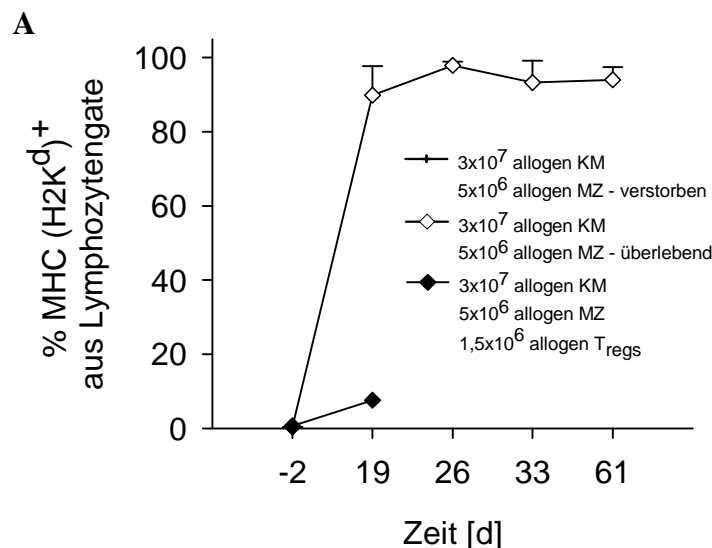


Abbildung 32: Murine MHC H2K^d-Expression nach allogener Transplantation zeigt das Anwachsen der transplantierten Spenderzellen.

A Das murine MHC H2K^d wurde vor der Transplantation (Tag -2) auf den Zellen der Empfängertiere (C57Bl/6-TTG) nicht exprimiert ($0,95\% \pm 0,34\%$). Die überlebenden Tiere zeigten bereits am Tag 19 eine H2K^d-Expression auf über 50% der Lymphozyten. Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Kontrollgruppe (3×10^7 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^6 Milzzellen (MZ)) und bei der Versuchsgruppe (3×10^7 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^6 Milzzellen (MZ) mit $1,5 \times 10^6$ T_{regs}-Kotransplantation) betrug die H2K^d-Expression weniger als 50%.

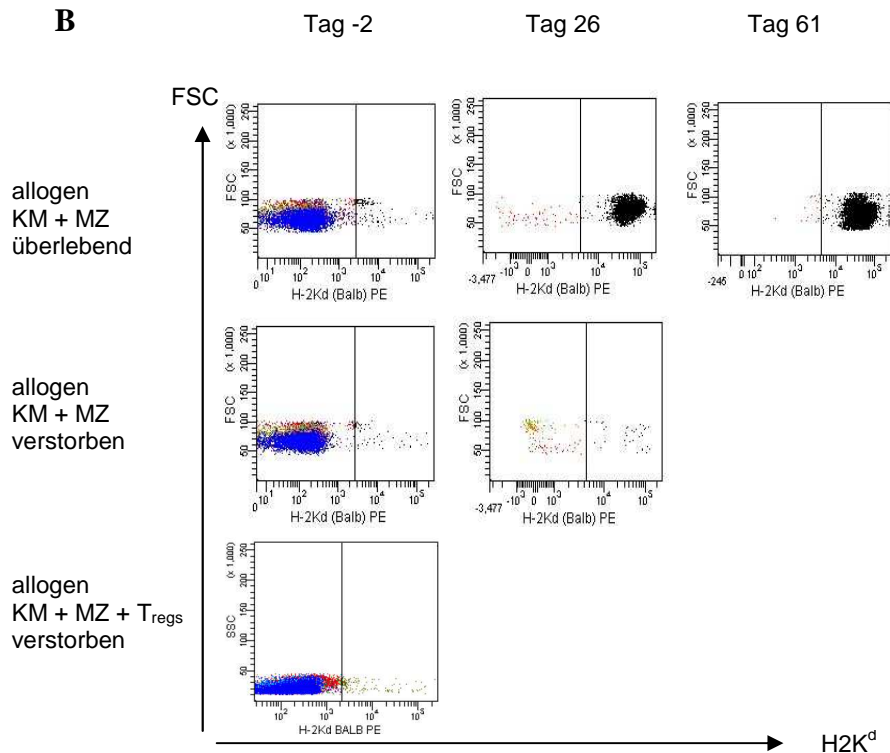


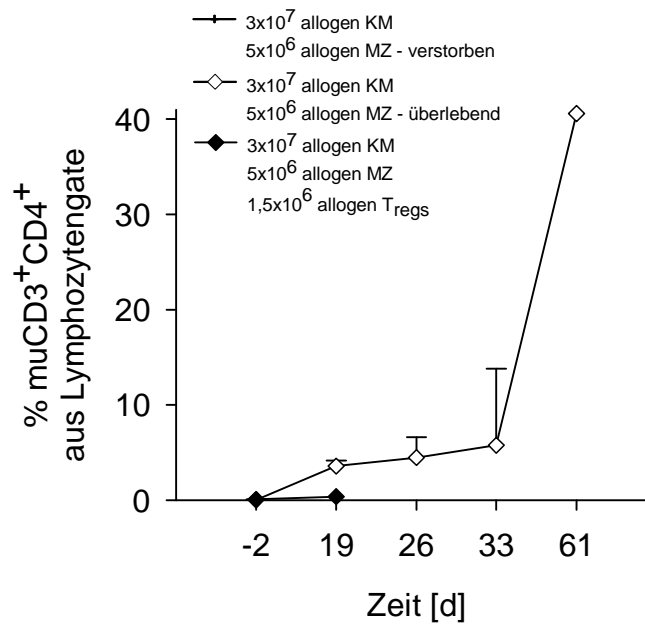
Abbildung 32: Murine MHC H2K^d-Expression nach allogener Transplantation zeigt das Anwachsen der transplantierten Spenderzellen.

B Durchflusszytometrische Darstellung von murinem MHC H2K^d auf Lymphozyten allogener transplantierte Tiere. Alle bunten Punkte, die rechts der senkrechten Linie eines Bildes liegen, stellen MHC H2K^d+ Zellen dar, Punkte links der Linie sind MHC H2K^d-. FSC = Forward Scatter.

4.4.2.4.3 Murine CD3⁺CD4⁺ T-Zellen nach allogener Transplantation - Anwachsen der Spenderzellen

Das murine CD4-Molekül wurde als Marker für die Balb/c-Spenderzellen verwendet, um das Anwachsen der transplantierten Zellen zu untersuchen. Nach allogener Transplantation konnte nur bei den überlebenden Mäusen aus TX-Exp 3, 4 und 5 ein muriner CD3⁺CD4⁺ Chimärismus nachgewiesen werden. Die frühzeitig verstorbenen Tiere besaßen keine T-Zellen, die murines CD4 exprimierten (Spender T-Zellen) (vgl. Abbildung 33 A und B). Da die transgenen Empfängerermäuse (C57Bl/6-TTG) vor der Transplantation kein murines CD4 exprimierten, zeigt der Nachweis von murinem CD4 bei den überlebenden Tieren, dass die transplantierten Spenderzellen (wildtyp Balb/c) im Knochenmark angewachsen und hämatopoetisch aktiv sind.

A



B

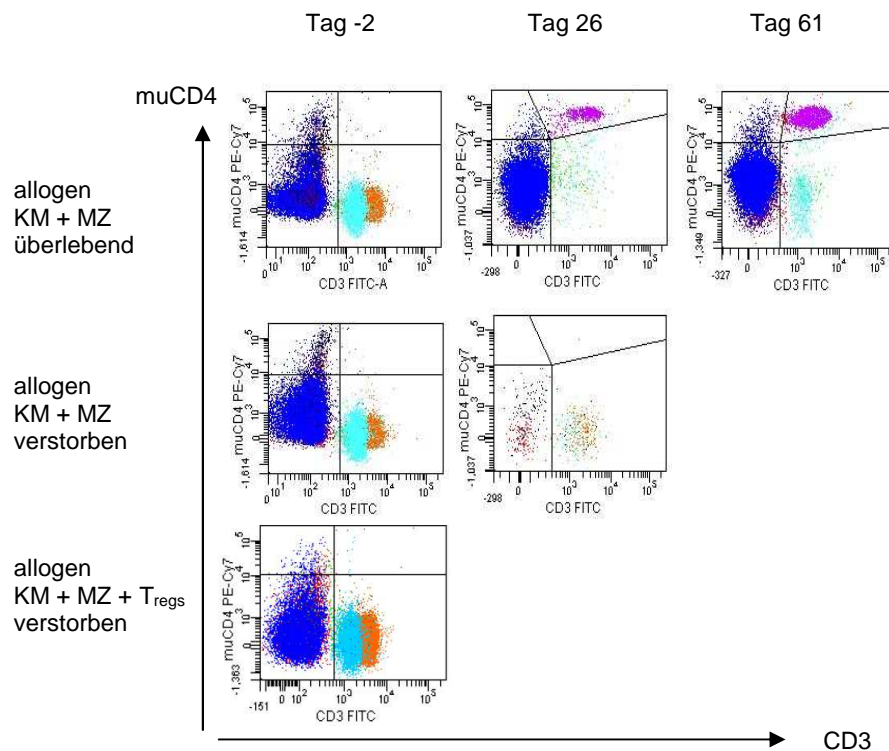


Abbildung 33: Murine CD3⁺CD4⁺-Expression nach allogener Transplantation zeigt das Anwachsen der transplantierten Spenderzellen.

A Die Expression von murinem CD4 (muCD4) auf den Empfängerlymphozyten spricht für das Anwachsen der transplantierten Spenderzellen. An Tag 19 liegt die muCD4-Expression bei den überlebenden Tieren der Kontrollgruppe (3x10⁷ Knochenmarkzellen (KM) und 5x10⁶ Milzzellen (MZ)) mit 16,02% ± 5,14% deutlich über der Expression der vorzeitig verstorbenen Tiere der Kontrollgruppe (0,77% ± 0,48%) und der Versuchsgruppe (3x10⁷ KM und 5x10⁶ MZ und 1,5x10⁶ T_{regs}) (0,16% ± 0,02%). **B** Durchflusszytometrische Darstellung von murinem CD3 und CD4 auf Lymphozyten allogener transplantierte Tiere. Die violetten Punkte stellen doppelt positive CD3⁺muCD4⁺ Lymphozyten (T-Helferzellen) dar, hellblaue und orangene Punkte sind CD3⁺ (andere T-Zellen) und dunkelblaue Punkte sind CD3⁻ Zellen (z.B. B-Zellen).

4.4.2.4.4 Murine CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen nach allogener Transplantation

Da CD3⁺CD8⁺ zytotoxische T-Zellen in der Pathogenese von Graft versus Host Disease eine entscheidende Rolle als Effektorzellen spielen, wurde deren Anzahl im Verlauf des Experiments untersucht. Die CD3⁺CD8⁺ zytotoxischen T-Zellen zeigten bei den vorzeitig verstorbenen Tieren nach allogener Transplantation ein anderes Bild, als bei den überlebenden Mäusen. Letztere hatten vergleichbare Verläufe wie die Tiere nach syngener Transplantation (vgl. Abbildung 22): Zu keinem Zeitpunkt fand ein Anstieg in der Anzahl der zytotoxischen T-Zellen statt. Alle CD3⁺CD8⁺ Zellen exprimierten ab Tag 19 H2K^d (vgl. Abbildung 34 A und B).

Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren nahm der prozentuale Anteil zytotoxischer T-Zellen vor dem Versterben zu. Am Tag 19 war ein Peak von CD3⁺CD8⁺ T-Zellen zu messen (TX-Exp 2: 40,50%; TX-Exp 3: 55,33% ± 3,03%; TX-Exp 4: 29,50% ± 19,00%)(vgl. Abbildung 34 A und B). Diese Zellen exprimierten kein H2K^d.

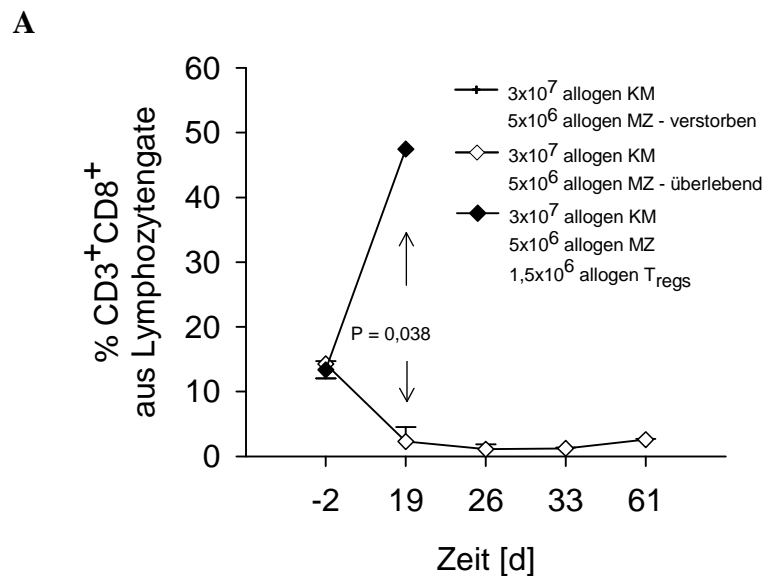


Abbildung 34: Murine CD3⁺CD8⁺-Expression nach allogener Transplantation.

A Die Anzahl zytotoxischer T-Zellen (CD3⁺CD8⁺) sank nach Transplantation bei den überlebenden Tieren der Kontrollgruppe (3x10⁷ Knochenmarkzellen (KM) und 5x10⁶ Milzzellen (MZ)) von 14,27% ± 0,44% (Tag -2) auf 2,28% ± 2,23% (Tag 19). Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Versuchsgruppe (3x10⁷ KM, 5x10⁶ MZ und 1,5x10⁶ T_{regs}) stieg der prozentuale Anteil CD3⁺CD8⁺ T-Zellen vor dem Tod auf 47,46% (Tag 19).

B

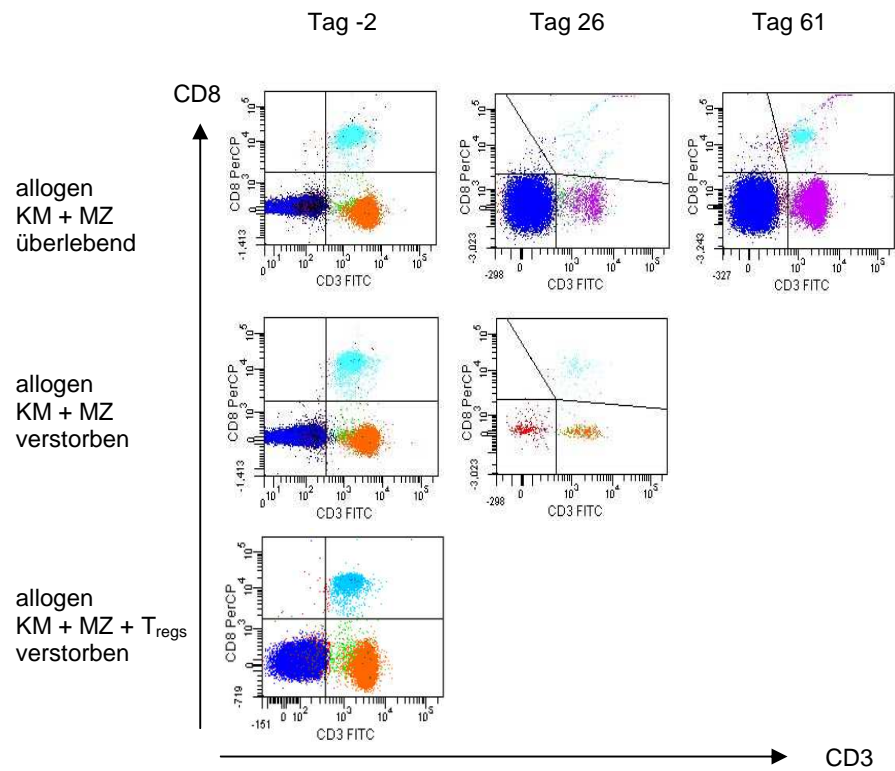


Abbildung 34: Murine CD3⁺CD8⁺-Expression nach allogener Transplantation.

B Durchflusszytometrische Darstellung von murinem CD3 und CD8 auf Lymphozyten allogen transplanterter Tiere. Die hellblauen Punkte stellen doppelt positive CD3⁺CD8⁺ Lymphozyten (zytotoxische T-Zellen) dar, violette und orangene Punkte repräsentieren CD3⁺ Zellen (andere T-Zellen) und dunkelblaue und rote Punkte sind CD3⁻ Zellen (z.B. B-Zellen).

4.4.2.4.5 $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ (Spender- T_{regs}) und $CD3^+CD4^-CD25^+FoxP3^+$ (Empfänger- T_{regs}) T-Zellen nach allogener Transplantation

Alle Tiere hatten nach allogener Transplantation, wie auch die Mäuse nach syngener Transplantation (vgl. Abbildung 23), weniger Gesamt- T_{regs} ($CD3^{+*}CD25^+FoxP3^+$ (* $CD3^+$ Zellen sind $muCD4^+$ und $muCD4^-$)) im peripheren Blut. Bei den frühzeitig verstorbenen Tieren aus TX-Exp2, 3, 4 und 5 stieg die Anzahl an Gesamt- T_{regs} vor dem Versterben nicht mehr an (vgl. Abbildung 35).

Die überlebenden Mäuse aus TX-EXP 3, 4 und 5 zeigten ab Tag 19 einen kontinuierlichen Anstieg der Gesamt- T_{regs} -Zahl, die mit einer Zunahme an $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen (Spender- T_{regs}) im Blut korrelierte (vgl. Abbildungen 35 und 36 A und B). Am Tag 61 waren 0,87% (TX-Exp 3), $1,28\% \pm 0,52\%$ (TX-Exp 4) und $1,50\% \pm 0,35\%$ (TX-Exp5) Spender- T_{regs} messbar.

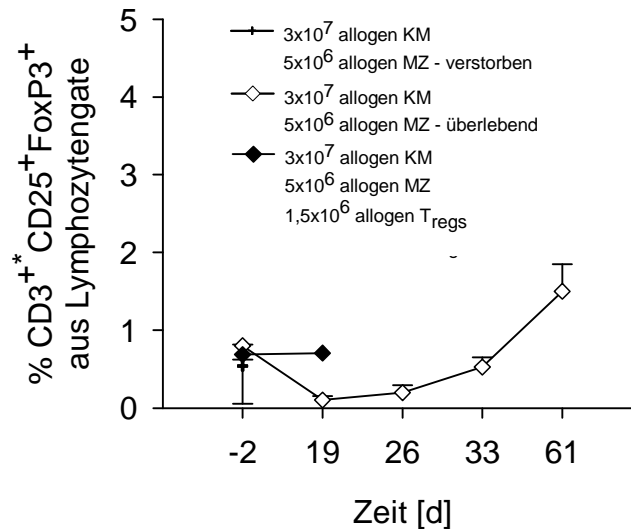


Abbildung 35: Gesamtzahl regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) ($CD3^{+*}CD25^+FoxP3^+$) nach allogener Transplantation.

Die Anzahl regulatorischer T-Zellen nahm in allen Gruppen nach Transplantation zunächst ab. Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Kontrollgruppe (3×10^6 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^6 Milzzellen (MZ)) und der Versuchsgruppe (3×10^6 KM, 5×10^6 MZ und $1,5 \times 10^6$ T_{regs}) stiegen die Werte kaum bzw. nicht, die überlebenden Tiere hatten am Experimentende (Tag 61) $1,50\% \pm 0,35\%$ $CD3^{+*}CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen (sind auch alle $CD4^+$, also Spender- T_{regs} (vgl. Abbildung 36)).

* $CD3^+$ Zellen sind $muCD4^+$ und $muCD4^-$.

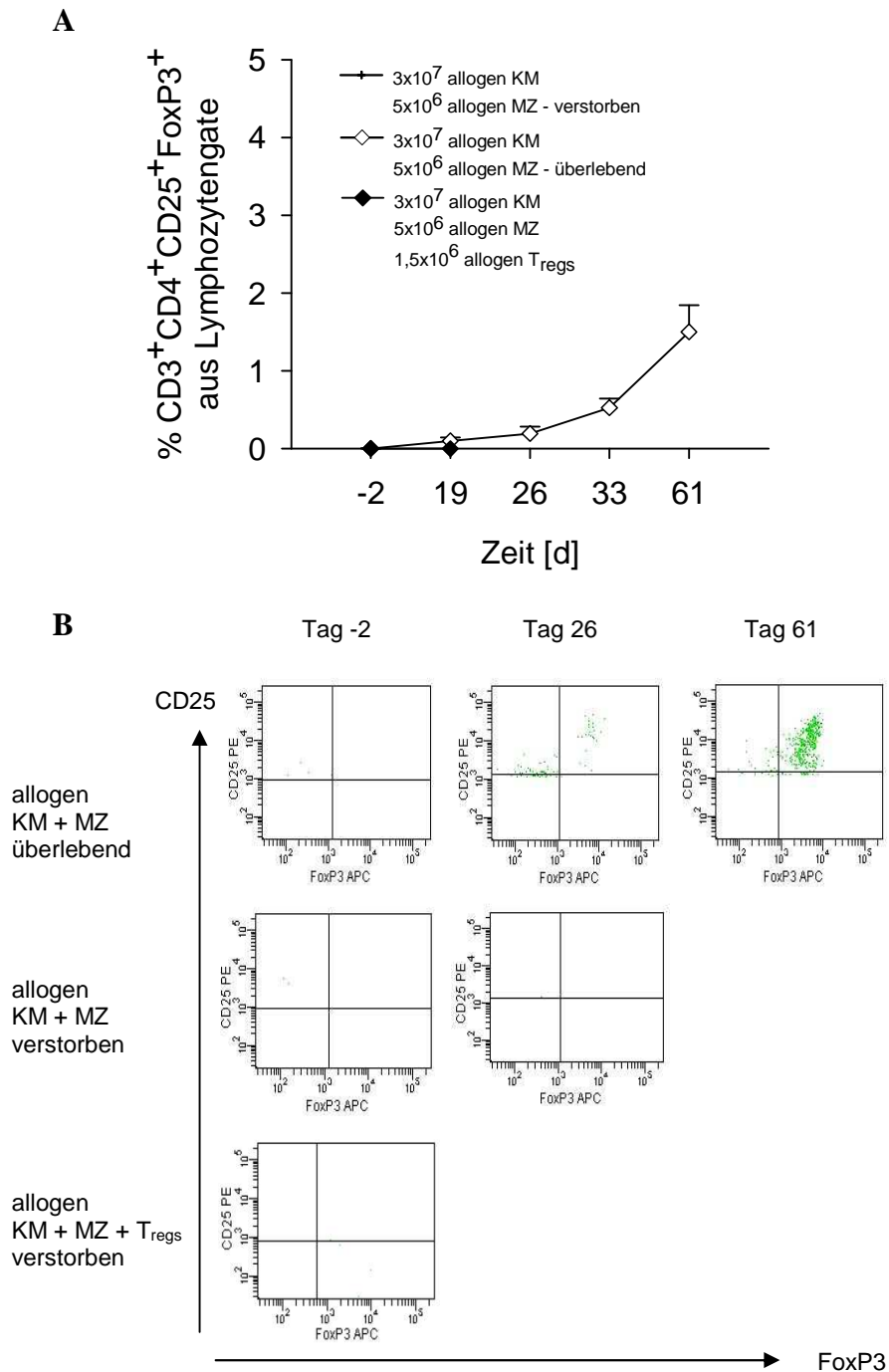


Abbildung 36: Spender- T_{regs} ($CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$) nach allogener Transplantation.

A Die Anzahl an Spender- T_{regs} stieg bei den überlebenden Tieren der Kontrollgruppe (3×10^7 Knochenmarkzellen (KM) und 5×10^6 Milzzellen (MZ)) nach Transplantation kontinuierlich von 0,0% (Tag -2) auf $1,50\% \pm 0,35\%$ (Tag 61). Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren der Kontroll- und der Versuchsgruppe (3×10^7 KM, 5×10^6 MZ und $1,5 \times 10^6$ T_{regs}) stiegen die Zahlen der $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ Zellen nicht an. **B** Durchflusszytometrische Darstellung von FoxP3 und CD25 auf $CD3^+CD4^+$ T-Lymphozyten allogene transplantierte Tiere. Die grünen Punkte im rechten oberen Quadranten jedes Bildes sind spendereigene $CD3^+CD4^+CD25^+FoxP3^+$ T-Zellen.

4.4.2.5 Histologie des Knochenmarks nach allogener Transplantation

Am Experimentende (Tag 61 nach Transplantation) wurden die Hinterbeine der Tiere präpariert und histologische Schnitte angefertigt. Dadurch konnten die vorher ermittelten Ergebnisse *in situ* veranschaulicht werden. Die Ergebnisse der KAO-Färbung entsprachen denen der WBC-Messung und der Chimärismusanalysen. In allen Experimenten waren in der Knochenhöhle des Oberschenkels der Bestrahlungskontrolltiere keine blutbildenden Knochenmarkzellen nachweisbar (vgl. Abbildung 37 C). Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren waren ebenfalls wenige Zellen in der Markhöhle zu sehen (vgl. Abbildung 37 B). Die überlebenden Tiere hingegen besaßen einen mit zahlreichen blutbildenden Zellen gefüllten Knochen (vgl. Abbildung 37 A).

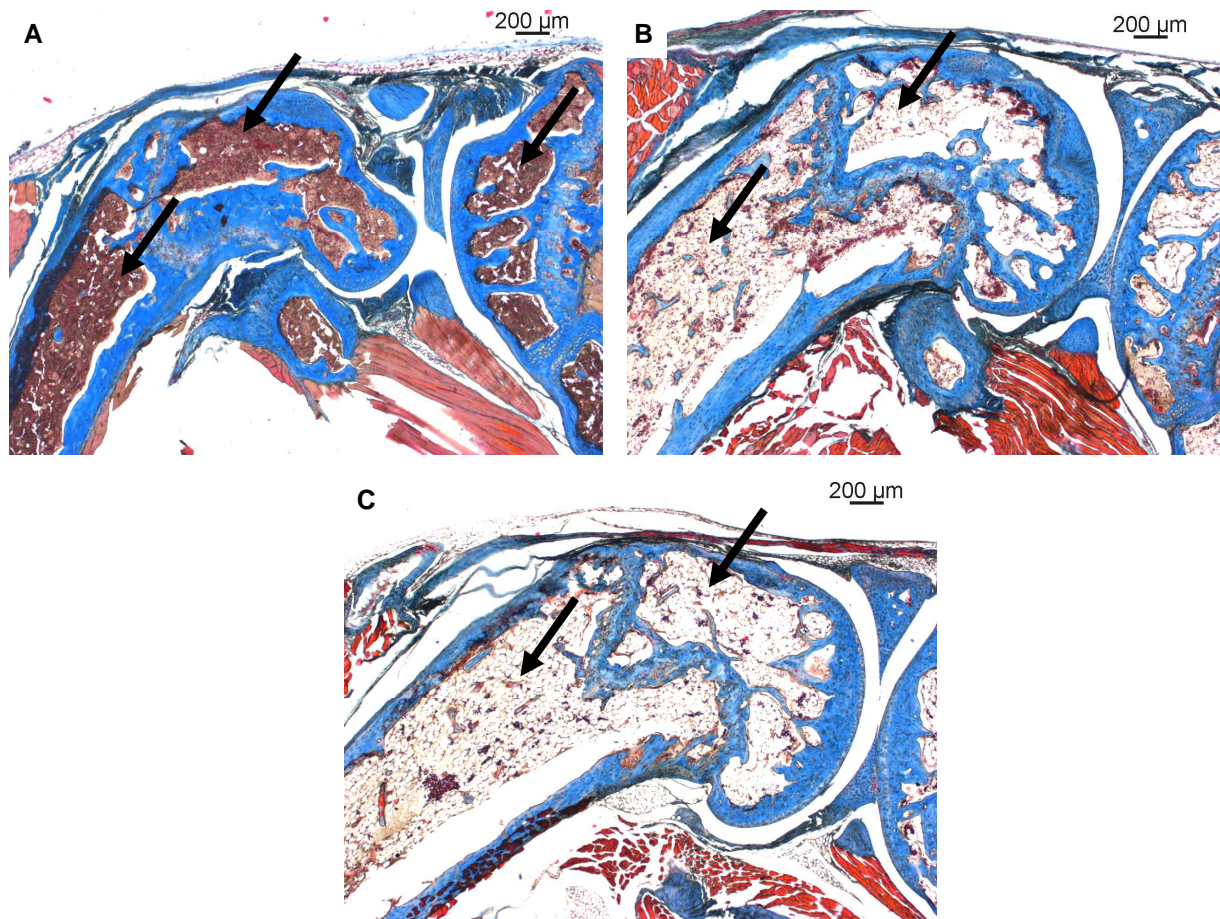


Abbildung 37: Lichtmikroskopische Darstellung histologischer Schnitte vom Knochenmark im Epikondylus des Femurknochens nach allogener Transplantation.

A Hinterbein einer überlebenden Maus, die nach Konditionierung (Ganzkörperbestrahlung) allogenen mit 1×10^7 Knochenmarkszellen und 5×10^6 Milzzellen transplantiert wurde. Bei dem überlebenden Tier ist die Knochenhöhle mit zahlreichen hämatopoetischen Zellen gefüllt, womit gezeigt ist, dass die Spenderzellen angewachsen sind und zu einer „neuen“ Hämatopoese geführt haben. **B** Hinterbein einer vorzeitig verstorbenen Maus, die nach Konditionierung allogenen mit 1×10^7 Knochenmarkszellen und 5×10^6 Milzzellen transplantiert wurde. Bei dem vor Versuchsende verstorbenen Tier ist kein hämatopoetisch aktives Knochenmark zu finden. **C** Hinterbein einer Maus, die bestrahlt wurde, jedoch keine Zellen transplantiert bekam (Bestrahlungskontrollgruppe mit 0,9%igen Natriumchloridlösung behandelt).

5 Diskussion

Regulatorische T-Zellen sind seit einigen Jahren in der Transplantationsmedizin ins Interesse vieler Forschungsgruppen gerückt. Die Eigenschaft dieser Zellen Immunreaktionen zu unterdrücken, spielt eine wesentliche Rolle bei der Therapie zur Verhinderung von Abstoßungsreaktionen nach Organtransplantation bzw. Graft versus Host Disease (GvHD) nach hämatopoetischer Stammzelltransplantation.

In der vorliegenden Arbeit stand die Frage im Mittelpunkt, welchen Einfluss regulatorische T-Zellen auf die Hämatopoese nach Stammzelltransplantation ausüben, ob sie einen stimulierenden oder hemmenden Effekt besitzen. Hierfür wurde ein Transplantationsmodell mit dreifach transgenen Mäusen (TTG) verwendet. Die TTG-Maus exprimiert die humanen CD4- und HLA-DR-Moleküle, gleichzeitig ist das murine CD4-Molekül ausgeschaltet. Somit repräsentieren das humane CD4- und das HLA-DR-Molekül das endogene Immunsystem, das murine CD4 die Spenderhämatopoese. Das Modell erlaubt anhand des murinen und humanen CD4- und des HLA-DR-Moleküls Chimärismusanalysen. Die Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen ist auch nach syngener Transplantation möglich, da durch den CD4-Chimärismus nicht auf MHC-Antigene zurückgegriffen werden muss.

Das TTG-Transplantationsmodell soll bei der Übertragung von Forschungsergebnissen aus Tiermodellen auf den Menschen behilflich sein und Informationen vor dem Einsatz eines möglichen Therapieverfahrens in klinische Studien liefern.

5.1 Gewinnung und Charakterisierung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Für die Gewinnung von CD4⁺CD25⁺ T-Zellen wurden Buffy Coats freiwilliger Spender (human) bzw. Milzzellen von Spendertieren (murin) verwendet.

Die Buffy Coats waren in ausreichender Zahl verfügbar, jedoch machte sich die Diversität unterschiedlicher Spender deutlich bemerkbar. Sowohl die Anzahl an gewonnenen PBMCs aus einem Buffy Coat als auch die Ausbeute CD4⁺CD25⁺ T-Zellen nach Separation variierten sehr stark. Um für Transplantationsexperimente genügend Zellen zur Verfügung zu haben, müsste man auf Spender zurückgreifen können, von denen bekannt ist, dass sie viele T_{regs} besitzen. Dadurch wäre die Anzahl an geeigneten Spendern jedoch sehr eingeschränkt und gewisse nachgewiesene Effekte wären eventuell spenderspezifisch.

Die Expansion dieser Zellen *in vitro* stellt eine Alternative zur Separation in großem Maße dar. Diese wird unter Punkt 5.2 diskutiert.

Bei der Gewinnung muriner $CD4^+CD25^+$ T-Zellen ist das Bestreben, die Anzahl an Spendertieren so gering wie möglich zu halten. Durchschnittlich konnten unabhängig vom Mausstamm 1×10^8 Zellen aus einer Milz gewonnen werden. In seiner Dissertation erhielt EDENHARTER (2005), allerdings nach Lyse der Erythrozyten, $5,7 \times 10^7$ Splenozyten/ Milz. Die 10-fach niedrigere Anzahl an Zellen pro Milz im Vergleich zu den eigenen Versuchen lässt sich sicherlich durch den zusätzlichen Lyseschritt und den damit verbundenen Waschschritten erklären, bei dem jedes Mal Zellen verloren gehen.

Aufgrund der Inzuchtmausstämme ergaben die Versuche der vorliegenden Arbeit sowohl bei den erhaltenen Milzzellen pro Tier als auch bei der Ausbeute $CD4^+CD25^+$ T-Zellen pro Separation sehr einheitliche Ergebnisse. Diese sprechen für die MACS-Technologie als geeignetes Verfahren zur Gewinnung regulatorischer T-Zellen für den Einsatz bei Transplantationsexperimenten.

Regulatorische T-Zellen stellen sowohl beim Menschen als auch bei der Maus lediglich 5-10% der $CD4^+$ -Lymphozyten im peripheren Blut dar. Aufgrund der Seltenheit der Zellen waren also keine größeren Ausbeuten aus den eingesetzten Ausgangszellgemischen zu erwarten.

Weiterhin ist der Phänotyp, nachdem die regulatorischen T-Zellen separiert werden, von entscheidender Bedeutung. Klassischerweise werden T_{regs} als $CD4^+CD25^+$ T-Zellen definiert. Es gibt eine Vielzahl weiterer Oberflächenmarker, die die Zellen näher charakterisieren: CTLA-4 (READ et al. 2000; TAKAHASHI et al. 2000; WING et al. 2008), CD62L (ERMANN et al. 2005; FENG et al. 2008), GITR (MCHUGH et al. 2002; SHIMIZU et al. 2002), CD127 (human) (HARTIGAN-O'CONNOR et al. 2007), LAG3 (HUANG et al. 2004). Jeder zusätzliche Marker in der Separation führt zu höherer Reinheit der T_{regs} , jedoch sinkt dadurch die Ausbeute. Bei den unterschiedlichen Separationsstrategien wird also immer ein Kompromiss zwischen Zellausbeute und Reinheit eingegangen.

Die MACS-Separation ist im Gegensatz zur fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung ein für die Zellen schonendes Verfahren (MILTENYI et al. 1990). Die Vitalität der Zellen nach der Separation ist sehr hoch und wurde mittels 7AAD-Färbung durchflusszytometrisch vor der Transplantation kontrolliert. Die (bei Positivselektionen) an den Zellen haftenden Antikörper bzw. Beads beeinflussen weder die Zellen in ihrer Funktion, noch haben sie einen nachteiligen Effekt im Empfängerorganismus nach der Transplantation (MILTENYI et al. 1990). Einschränkungen gibt es bei diesem Verfahren jedoch wegen der begrenzten Zellkapazität pro Säule. Separationen regulatorischer T-Zellen in großem Maße (etwa für den

Routineeinsatz in der Klinik) sind aufgrund des hohen Aufwands an Material und Zeit bisher nicht durchführbar.

Die durchflusszytometrische Messung der FoxP3-Expression nach Separation diene der Bestimmung der Reinheit der isolierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen. Der Transkriptionsfaktor FoxP3 wurde in den letzten Jahren intensiv erforscht. Es sind noch viele Fragen bezüglich der Wirkweise des FoxP3-Proteins ungeklärt. Als gesichert gilt, dass die Expression von FoxP3 in CD4⁺CD25⁺ T-Zellen mit immunsuppressiven Wirkungen korreliert (SCHUBERT et al. 2001; FONTENOT et al. 2003; KASPROWICZ et al. 2003; LIU et al. 2006).

Um die funktionelle Aktivität der für die Transplantationsexperimente separierten Zellen zu bestimmen, wurde deren Zytokinproduktion untersucht. Es sollte vor Transplantation sichergestellt sein, dass es sich um funktionelle T_{regs} handelte. CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen produzieren im Gegensatz zu aktivierten CD4⁺CD25⁺ T-Effektorzellen kein Interleukin-2 (SAKAGUCHI 2004; ZHENG und RUDENSKY 2007). Durch ELISpot-Assays konnte gezeigt werden, dass die separierten CD4⁺CD25⁺ T-Zellen kein Interleukin-2 sezerniert haben, wie es für regulatorische T-Zellen typisch ist. Bei den humanen Zellen wurde zusätzlich IFN- γ untersucht, das ebenfalls nur von proinflammatorischen T-Effektorzellen gebildet und freigesetzt wird (ROBINSON et al. 2004) und im Assay bei den separierten CD4⁺CD25⁺ nicht nachweisbar war.

Die von regulatorischen T-Zellen produzierten bzw. auch nicht sezernierten Zytokine geben Aufschluss über die Funktionalität der Zellen und der Zytokinnachweis dient der weiteren Charakterisierung (unabhängig vom Genotyp). Die Suppressionsmechanismen regulatorischer T-Zellen sind sehr vielfältig und Zytokine spielen dabei neben zellkontaktabhängigen Interaktionen eine entscheidende Rolle (LEVINGS et al. 2002; CHEN et al. 2003; HUBER et al. 2004).

5.2 Zellkultur muriner CD4⁺CD25⁺ T-Zellen

Aufgrund des natürlicherweise geringen Vorkommens regulatorischer T-Zellen ist das Bestreben vieler Arbeitsgruppen, diese Zellen *in vitro* zu vermehren (HOFFMANN et al. 2004; HUBER et al. 2004; HOFFMANN et al. 2006b; GOLOVINA et al. 2008). In der vorliegenden Arbeit wurden murine CD4⁺CD25⁺ T-Zellen direkt nach Separation auf Zellkulturplatten ausgesetzt und ihr Wachstumsverhalten im Vergleich zu Milzzellen untersucht. Da es in der Natur regulatorischer T-Zellen liegt, hemmende Funktionen auf Immunreaktionen und somit auf die Proliferation von Effektorzellen auszuüben, war die

deutlich geringere Expansionsrate der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (1,6 fach) (Milzzellen proliferierten 8,2 fach) ein zu erwartendes Ergebnis (TAAMS et al. 2001).

Des Weiteren wurde der Phänotyp der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen nach einwöchiger Expansion analysiert. Nach 7 Tagen in Kultur exprimierten lediglich noch $3,52\% \pm 2,29\%$ der $CD4^+CD25^+$ T-Zellen FoxP3 (an Tag 0 waren es $74,04\% \pm 10,17\%$). Dieser Verlust lässt sich einerseits durch mögliche Kontamination der Kultur mit Effektorzellen andererseits durch instabile Genexpression (methyliert vorliegendes Gen) erklären.

Die MACS-Separation ist zwar ein für die Zellen schonendes und auch steril durchzuführendes Verfahren, jedoch lässt sich die Kontamination mit Effektorzellen nicht verhindern (TRZONKOWSKI et al. 2008). Diese ebenfalls $CD4^+CD25^+$ Zellen, bei humanen Zellen exprimieren sie $CD127^+$ (DI et al. 2009), überwuchern unter gegebenen Kulturbedingungen die erwünschten T_{regs} (TAAMS et al. 2001a). Alle $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, die an Tag 0 kein FoxP3 exprimierten und alle restlichen $CD4^+CD25^-$ proliferierten besser und überwucherten somit die regulatorischen T-Zellen.

HOFFMANN et al. (2009) beschrieben bei humanen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, dass die FoxP3-Expression nach wiederholter Stimulation abnimmt. Seit einigen Jahren wird bei regulatorischen T-Zellen vermehrt auf das Methylierungsmuster des FoxP3-Gens geachtet. Die epigenetische Regulation der FoxP3-Genexpression spielt eine entscheidende Rolle (FLOESS et al. 2007). BARON et al. 2007 zeigten, dass nur im demethylierten Zustand das FoxP3-Gen stabil exprimiert wird. Bei induzierten T_{regs} ist dies von besonderer Bedeutung, da bei diesen Zellen das Gen methyliert vorliegt und demzufolge die Expression starken Schwankungen unterliegt (POLANSKY et al. 2008), bei konventionell separierten natürlichen T_{regs} ist das FoxP3-Gen demethyliert und wird stabil exprimiert. Diese Tatsache spielt für die Expansion *in vitro* eine große Rolle, da Zellen mit methyliertem FoxP3-Gen besser proliferieren, jedoch auch weniger suppressiv wirken als solche mit demethyliertem Gen.

Eine Möglichkeit den FoxP3-Verlust zu verhindern, haben SU et al. (2008) beschrieben, indem sie durch Stimulation mit TGF- β die FoxP3-Expression der Zellen in Kultur erhalten konnten. Schon YAMAGIWA et al. (2001) hatten die Bedeutung von TGF- β auf die Induktion suppressiver Eigenschaften von $CD4^+$ Zellen erkannt. Die Kultivierungsmethode mit TGF- β führt jedoch zu induzierten regulatorischen T_{regs} , die wie FLOESS et al. (2007) und POLANSKY et al. (2008) beschrieben haben, nicht stabil FoxP3 exprimieren.

Für alle durchgeführten Transplantationsexperimente wurden natürliche regulatorische T-Zellen verwendet. Für den Nachweis eines Effektes der Zellen auf die Hämatopoese war die

stabile FoxP3-Expression bzw. die Sicherheit der suppressiven Eigenschaften von besonderer Relevanz. Bei induzierten T_{regs} bestünde die Gefahr, dass die Zellen durch die instabile FoxP3-Expression ihre Funktionseigenschaften verlieren könnten.

Für den Einsatz regulatorischer T-Zellen bei Stammzelltransplantationen, als GvHD-Therapie bzw. -Prophylaxe, wäre die Expansion der Zellen von großem Vorteil, da die Separation natürlicher T_{regs} in großem Maße für den klinischen Einsatz nicht praktikabel ist. Aus diesem Grund sind auch Transplantationsexperimente mit *in vitro* expandierten bzw. induzierten T_{regs} durchzuführen.

5.3 Syngenes Transplantationsexperiment

Bei der syngen Transplantation handelt es sich um die Übertragung von Zellen zweier genetisch identischer Organismen (in diesem Fall zweier Inzuchtmäuse eines Stammes). Spender und Empfänger haben gleiche Major-Histokompatibilitäts-Antigene (MHC-Antigene), ihre Gewebemerkmale unterscheiden sich also nur minimal (in sog. Minor-Histokompatibilitäts-Antigenen). Es sind keine Abstoßungsreaktionen bzw. es ist kein Auftreten von Graft versus Host Disease zu erwarten, dennoch gibt es Berichte, dass transplantierte Zwillinge GvHD ausbilden (RAPPEPORT et al. 1979). Dieses syngene Modell, das klinisch eine autologe Transplantation simuliert, ist daher gut geeignet, Effekte der Kotransplantation regulatorischer T-Zellen auf die Wiederherstellung der Hämatopoese nach Bestrahlung zu untersuchen.

Wichtigster zu untersuchender Parameter war das Überleben der Tiere. Wie angenommen überlebten alle Tiere das Experiment (TX-Exp 1). Die Gewichtsverläufe, welche auf den klinischen Status der Tiere schließen lassen, zeigten nach anfänglichem Gewichtsverlust nach Bestrahlung und Transplantation einen stetigen Anstieg der Körpermasse. Die Unterschiede in den Gewichten zwischen Versuchs- und Kontrollgruppe sind durch unterschiedliches Alter zu erklären. Die TTG-Zucht bringt nicht immer genügend uniforme Tiere hervor, so dass die Gruppen nach Alter und Geschlecht eingeteilt werden. Die prozentuale Darstellung des Gewichts in % des Ausgangsgewichts bestätigt jedoch den initialen Verlust an Körpermasse nach der Bestrahlung in beiden Gruppen. Dieses Phänomen wurde bereits in vorherigen Transplantationsversuchen der Arbeitsgruppe mit dreifach transgenen Mäusen beobachtet (Daten nicht gezeigt).

Die Leukozytenzahlen (WBC) verhielten sich im Verlauf in Versuchs- und Kontrollgruppe ähnlich. Die WBC-Bestimmung diente einerseits dazu, das Modell verlässlich und valide zu

machen und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu kontrollieren, andererseits spiegeln die WBC-Werte die Effekte der Bestrahlung und Transplantation auf die Hämatopoese wieder. Wie zu erwarten war, nahm die Anzahl an weißen Blutkörperchen nach Bestrahlung deutlich ab (TOMITA et al. 1994; ZHANG et al. 2009). Dabei sank der Wert in der Versuchsgruppe nicht so weit ab wie in der Kontrollgruppe. Da die Bestrahlungsdosis für jedes Tier gewichtsabhängig ermittelt wurde, ist der geringere Abfall des WBC-Wertes in der Versuchsgruppe nicht auf das höhere Gewicht der Tiere zurückzuführen. Ab der zweiten Woche nach Transplantation stiegen die Leukozytenwerte kontinuierlich an und erreichten zum Experimentende die Ausgangswerte. Durch die Ganzkörperbestrahlung wurde eine Myeloablation (myeloablative Konditionierung) mit Immunsuppression erreicht, die Bedingung für das Anwachsen transplantierter Zellen ist (TOMITA et al. 1994a). FRICKE et al. (2009) entwickelten Modellfunktionen, die das Verhalten von Leukozyten nach Bestrahlung als exponentielle und sigmoide Funktion beschreiben. Diese Funktionen spiegeln typische Wachstums- und Regenerationsprozesse in biologischen Systemen wieder.

Im Differentialblutbild zeigte sich in beiden Gruppen die granulozytäre und monozytäre zeitlich vor der lymphozytären Rekonstitution. Dies ist Ausdruck der schnelleren Wiederherstellung der Zellen der unspezifischen Immunabwehr (Monozyten, Makrophagen, neutrophile Granulozyten, natürliche Killerzellen) (ROBERTSON 1998). Durch die myeloablative Konditionierung wurde das immunologische Gedächtnis (B- und T-Memoryzellen) der spezifischen Abwehr ausgeschaltet und die Entstehung neuer Memoryzellen benötigt gewisse Zeit (SPRENT und SURH 2001).

Um das Anwachsen („Engraftment“) transplantierter Zellen zu untersuchen, wurden durchflusszytometrischen Chimärismusanalysen bezüglich des humanen CD4- und des HLA-DR-, des MHC-, des murinen CD4- und des CD8-Moleküls durchgeführt. Die humanen Oberflächenmarker waren nach Bestrahlung bis zum Ende des Experiments nicht mehr nachweisbar. Dies bedeutet, dass die Hämatopoese nach Bestrahlung und Transplantation nicht mehr von den empfängereigenen Stammzellen ausging (keine endogene Hämatopoese). Die Rekonstitution der endogenen Hämatopoese wurde nach Transplantation allogener und syngener nicht adhärenter Knochenmarkzellen in dreifach transgene Mäuse beobachtet (FRICKE et al. 2009).

Das C57Bl/6-eigene MHC-Molekül H2D^b war sowohl vor als auch nach syngener Transplantation und Bestrahlung auf nahezu allen Lymphozyten nachweisbar. Die TTG-Empfängermäuse haben einen genetischen Hintergrund einer C57Bl/6-Maus, exprimierten

also vor Behandlung H2D^b, nach der Bestrahlung wurde das H2D^b-Molekül durch das Anwachsen der Spenderzellen im Empfänger exprimiert. Diese Untersuchung war notwendig, um ein stabiles syngenes Transplantationssystem nachzuweisen.

Zytotoxische T-Zellen wurden im Verlauf des Experiments wegen ihrer Bedeutung als Effektorzellen bei GvHD untersucht. Es war ein geringer Abfall der CD8⁺ Zellzahlen nach Transplantation bei beiden Gruppen zu beobachten, der, wie nach syngener Transplantation zu erwarten, auf keinerlei Immunreaktion (GvHD) schließen ließ.

Als weiterer Chimärismusmarker diente in diesem Modell das murine CD4-Molekül. Das Vorhandensein deutete auf das Anwachsen der Spenderzellen hin, da die endogenen Zellen des Empfängers kein murines CD4 exprimierten. Am Tag 19 des Experiments war in der Versuchsgruppe signifikant mehr murines CD4 auf den Lymphozyten nachweisbar als in der Kontrollgruppe. Bei Kotransplantation von T_{regs} war also ein schnelleres Anwachsen der Zellen bzw. eine schnellere Rekonstitution der Hämatopoese nachweisbar. Die Mechanismen, die das Engraftment der Spenderzellen fördern, sind nicht vollständig geklärt. Sicherlich begünstigen T_{regs} die Blutbildung durch das Ausbleiben einer Entzündungsreaktion (durch Hemmung der Proliferation von Effektorzellen) und das Fehlen großer Mengen proinflammatorischer (IL-2, IFN- γ) bzw. die Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (IL-4, IL-10, TGF- β). Außerdem zeigten ZOU et al. (2004), dass die Expression bestimmter Chemokinrezeptoren (CCR4, CCR8) auf humanen T_{regs} die Wanderung der Zellen ins Knochenmark begünstigen.

Anhand des CD4-Moleküls war es ebenfalls möglich, zwischen Spender- und Empfänger-T_{regs} zu differenzieren. Während sich der Verlauf der Gesamt-T_{regs} (Spender- + Empfänger-T_{regs}) in den Gruppen gleich verhielt (der Abfall von Tag -2 bis 19 in der Versuchsgruppe und der zeitgleiche Anstieg in der Kontrollgruppe ist auf unterschiedliche Ausgangswerte zurückzuführen), unterschieden sich die Verläufe der Spender-T_{regs}. An Tag 19 waren in der Versuchsgruppe signifikant mehr Spender-T_{regs} nachweisbar. Dieser Unterschied war ab Tag 26 nicht mehr signifikant und zum Ende des Experiments nicht mehr vorhanden. Der Mechanismus sollte in weiteren Experimenten aufgeklärt werden.

Die histologischen Untersuchungen am Experimentende dienten der Beurteilung der Knochenmarkarchitektur. In der Klinik werden beim Menschen neben Knochenmarkpunktionen auch Knochenmarkbiopsien gewonnen, um diese auf Infiltration markfremder Elemente und maligne Zellen zu untersuchen. Die Anfertigung eines histologischen Schnittes erlaubt es auch Zellen, die nicht aspiriert werden können, zu beurteilen. Die verstorbenen Tiere aus der Bestrahlungskontrollgruppe zeigten eine nahezu

zellfreie Knochenhöhle als Folge der myeloablativen Bestrahlung. Die syngen transplantierten Mäuse hatten zum Ende des Experiments ein hämatopoetisch aktives Knochenmark.

Insgesamt konnte im syngen Transplantationsmodell ein schnelleres Anwachsen und damit verbunden eine schnellere Rekonstitution der Hämatopoese in der kotransplantierten Versuchsgruppe beobachtet werden. Dabei lag ein kompletter Donor-Zell-Chimärismus vor, endogene hämatopoetische Regeneration konnte nicht beobachtet werden. Dies könnte ein Vorteil bei der Anwendung von regulatorischen T-Zellen als Kotransplantationsstrategie darstellen. Die Stimulation von endogenen Zellen ist nicht immer von Vorteil bei Stammzelltransplantationen. Zwar kommt es durch das Einsetzen der eigenen Hämatopoese zu keinen Abstoßungsreaktionen bzw. zu keiner GvHD, andererseits kann durch Stimulation der endogener Stammzellen die Grunderkrankung wieder auftreten (Relapse), da z.B. einige Tumorstammzellen durch die Bestrahlung oder Chemotherapie nicht beseitigt werden (CLARKE 2005; LIN et al. 2009).

5.4 Allogene Transplantationsexperimente

Bei der allogenen Transplantation sind Spender- und Empfängerorganismus nicht genetisch identisch, d.h. bei Stammzelltransplantationen ist einerseits das Anwachsen der Spenderzellen erschwert (diese können durch den Empfängerorganismus abgestoßen werden), andererseits ist im weiteren Verlauf mit dem Auftreten von Spender-gegen-Empfänger-Reaktionen (GvHD) zu rechnen.

Die GvHD ist die häufigste Komplikation nach allogener Stammzelltransplantation (FERRARA et al. 1996; BARTON-BURKE et al. 2008). Bei schweren Graden der GvHD werden Kortikoide, Mycophenolat-Mofetil (Hemmer der Inosinmonophosphat-Dehydrogenase) und Cyclosporin A (Calcineurininhibitor) sowie Antikörper (Anti-T-Lymphozyten-Globulin OKT 3) eingesetzt, um diese Immunreaktionen zu kontrollieren (HERTEL 2010). Bis zu einem gewissen Grad ist eine Reaktion der Spenderzellen gegen den Empfänger jedoch auch erwünscht. Der sog. Graft versus Tumor (GvT) Effekt sorgt für die Bekämpfung entarteter Empfängerzellen (EDINGER et al. 2003; JONES et al. 2003).

Die allogenen Transplantationsexperimente (TX-Exp 2-5) zeigten eine Erhöhung der Überlebensrate mit zunehmender Zellzahl im Transplantat. Um das allogene Transplantationsmodell in TTG-Mäusen zu etablieren, mussten mehr Zellen transplantiert werden im Vergleich zur syngen Transplantation. Auch der Vergleich mit Wildtyptieren als

Empfänger zeigte, dass die dreifach transgene Maus viel mehr Zellen im Transplantat zum Überleben benötigt (Daten in der Arbeit nicht gezeigt). Bei 2×10^6 Knochenmarkzellen im Inokulum (mit oder ohne 1×10^6 T_{regs}) verstarben alle Tiere im Verlauf des allogenen Experiments. Bei Erhöhung der Knochenmarkzellen auf 1×10^7 und Zusatz von 5×10^6 Milzzellen überlebten 25% der Mäuse, bei 3×10^7 Knochenmarkzellen und 5×10^6 Milzzellen überlebten 50% der Tiere. Es wurde deutlich, dass die initial gewählten Zellzahlen zu gering waren, um im Empfänger anzuwachsen und die Hämatopoese nach Bestrahlung wieder in Gang zu bringen. Die transplantierten Zellen wurden von den Empfängertieren als fremd erkannt und eliminiert bzw. das Anwachsen wurde verhindert (Graft failure). Durch das Ausbleiben der Neubildung von Blutzellen waren die Tiere im Verlauf der Experimente zunehmend geschwächt. Futter- und Wasseraufnahme waren durch das verminderte Allgemeinbefinden ebenfalls gestört, so dass die Tiere (wenn sie nicht aus Tierschutzgründen zuvor euthanasiert wurden) an Exsikkose bzw. allgemeiner Schwäche verstarben.

Die höchsten Zellzahlen führten hingegen zur hämatologischen Rekonstitution bei den überlebenden Tieren.

Bei der ermittelten Zellzahl von 3×10^7 Knochenmarkzellen und 5×10^6 Milzzellen, die zu einem Überleben von 50% der Tiere führte, wurde mit der Durchführung einer Versuchsgruppe mit diesen Zellzahlen mit T_{regs}-Kotransplantation der Effekt von regulatorischen T-Zellen auf das Anwachsen des Transplantats und die Rekonstitution der Hämatopoese untersucht (TX-Exp 5). Anders als im syngenem Modell, in dem T_{regs} die Rekonstitution der Hämatopoese beschleunigten, führte nach allogener Transplantation die Kotransplantation von regulatorischen T-Zellen zu einer Verlangsamung bzw. Verhinderung des Engraftments. Dieser Effekt ist möglicherweise auf die gewählten Mausstämme zurückzuführen. Die Verwendung der „wenig immunogenen“ Balb/c-Mäuse als Spender wäre eine Erklärung für die benötigte hohe Zellzahl, um ein Anwachsen des Transplantats zu erzielen. Balb/c-Mäuse sind sog. „Th2-Responder“, d.h. bei Stimulation des Immunsystems werden vor allem antiinflammatorische Zytokine (IL-4, IL-5, IL-10) freigesetzt (FIORENTINO et al. 1989). C57Bl/6-Mäuse hingegen sind typische „Th1-Responder“ (MILLS et al. 2000, MOSMANN et al. 1986), die nach Antigenkontakt proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL-2) sezernieren und mit erhöhter Antigenpräsentation und Produktion opsonisierender Antikörper und zytotoxischer T-Zellen reagieren. Die transplantierten Balb/c-Zellen werden von den „aggressiven“ C57Bl/6-Empfängerzellen (Makrophagen, Monozyten) schon vor dem Anwachsen erkannt und beseitigt.

Das erschwerte Anwachsen der Spenderzellen nach Zugabe von regulatorischen T-Zellen zum Transplantat könnte auf die zusätzliche Hemmung durch spendereigene T_{regs} zur ohnehin schwachen Immunreaktion von Seiten der Spenderzellen zurückzuführen sein (vgl. Abbildung 38). Die transplantierten T_{regs} hemmen die Proliferation anderer Zellen (insb. $CD4^+$ T-Effektorzellen) und verhindern somit auch ein mögliches Anwachsen. T_{regs} unterdrücken einerseits durch Verbrauch von proinflammatorischem IL-2 (vgl. Abbildung 2), andererseits durch Ausschüttung antiinflammatorischer Zytokine (TGF- β , IL-10) (vgl. Abbildung 3) die Immunreaktion der Spenderzellen. Die Empfängerzellen unterliegen keiner Hemmung und beseitigen mittels Entzündungsreaktionen die fremden Spenderzellen.

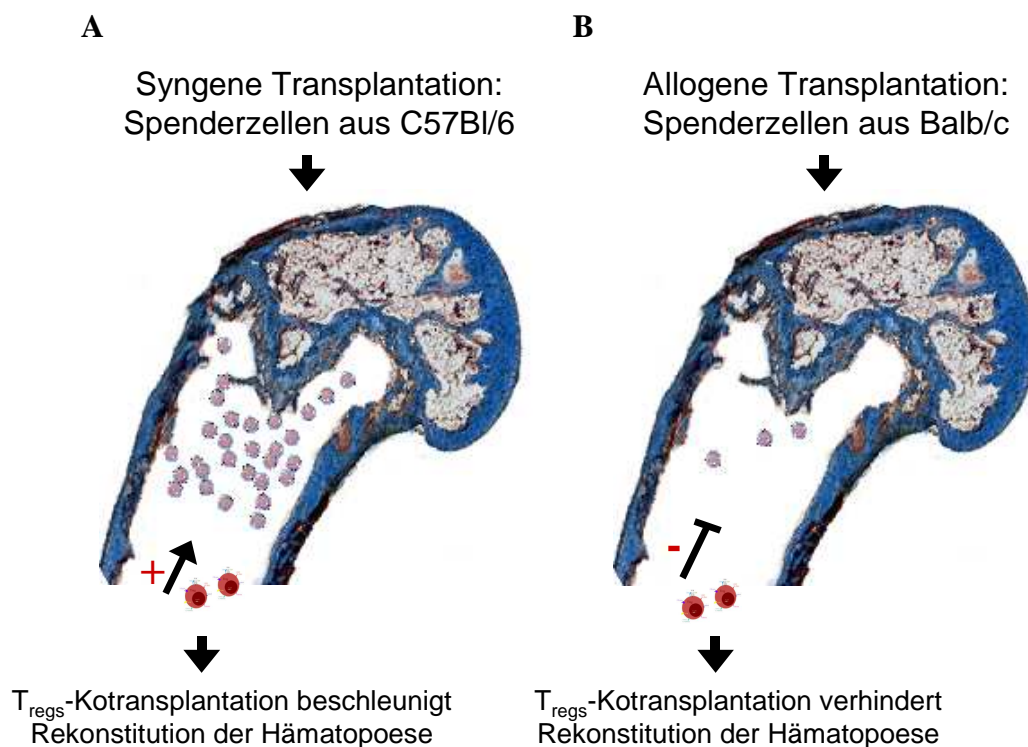


Abbildung 38: Fördernder bzw. hemmender Effekt regulatorischer T-Zellen (T_{regs}) auf die Rekonstitution der Hämatopoese.

A Bei syngener Transplantation fördern T_{regs} das Anwachsen der Spenderzellen bzw. beschleunigen den Wiedereintritt der Hämatopoese. **B** Bei allogener Transplantation hemmen T_{regs} die immunologischen Entzündungsreaktionen, die die Spenderzellen im Empfängerorganismus auslösen. Dadurch wird das Anwachsen des Transplantats bzw. die Rekonstitution der Hämatopoese erschwert.

Zu untersuchen wäre, ob durch die Wahl eines anderen allogenen Mausstammes (bevorzugt auch ein Th1-Responder wie z.B. B10.D2) oder durch die Kotransplantation empfängereigener regulatorischer T-Zellen das Anwachsen des Transplantats im allogenen Transplantationsmodell erleichtert wird und das Überleben verbessert werden kann. Alternativ wäre zu klären, ob es von Vorteil wäre, bei allogenen hämatopoetischen

Stammzelltransplantationen auf eine hohe Konzentration regulatorischer T-Zellen zu verzichten.

Der Gewichtsverlauf verhielt sich nach allogener Transplantation bei allen Tieren ähnlich und spiegelte das Allgemeinbefinden der Tiere wieder. In den ersten Wochen nach Ganzkörperbestrahlung nahmen alle Tiere ab. Dieser Gewichtsverlust ist auch in anderen Arbeitsgruppen beschrieben (HOFFMANN et al. 2002; JONES et al. 2003; ZHANG et al. 2009). Während die überlebenden Mäuse ab Tag 14 nach Transplantation wieder zunahmen, verloren die frühzeitig verstorbenen Tiere alle weiter an Gewicht. Dies ist auf das Transplantatversagen und nicht auf das Auftreten einer GvHD zurückzuführen, da eine leukozytäre Rekonstitution nicht erfolgt war ($\text{WBC} < 1 \times 10^3/\text{mm}^3$).

Nach Bestrahlung erfuhren alle Tiere eine ausgeprägte Leukozytopenie mit WBC-Werten unter $1 \times 10^3/\text{mm}^3$. Wie auch von anderen Arbeitsgruppen beschrieben, sind die niedrigen Leukozytenwerte nach Ganzkörperbestrahlung in den ersten zwei Wochen nach Behandlung messbar (TSUBOI et al. 1991; TOMITA et al. 1994). Während sich die frühzeitig verstorbenen Tiere von der Leukozytopenie nicht erholten, stiegen die Werte bei den überlebenden Mäusen ab Tag 12 bis 19 wieder an und erreichten die Initialwerte. Die Messung dieser Werte diente neben der Verlaufsuntersuchung der Validierung des Modells.

Das Differentialblutbild konnte nur bei den überlebenden Tieren ermittelt werden, wenn der WBC-Wert über $1 \times 10^3/\text{mm}^3$ lag. Wie auch bei der syngen Transplantation war hierbei eine relative Granulo- und Monozytose nachweisbar.

Die Chimärismusanalysen ergaben deutlich unterschiedliche Verläufe zwischen den verstorbenen und überlebenden Tieren und ließen so auf unterschiedliches Engraftmentverhalten innerhalb der Gruppen schließen. Beim humanen CD4-Molekül zeigte sich bei den überlebenden Tieren ein vergleichbares Bild zur syngen Transplantation: Im Verlauf des Experiments nahm die Menge an nachweisbarem humanen CD4 kontinuierlich ab. Bei den frühzeitig verstorbenen Tieren konnte zunächst kein Abfall des humanen CD4 nachgewiesen werden. Dieser Erhalt des Moleküls deutet auf die Mobilisierung letzter empfängereigener Zellen hin. Die Tiere hatten zu diesem Zeitpunkt nur sehr wenige Blutzellen, so dass die prozentual hohe CD4-Expression absolut gesehen nur wenige Zellen betraf.

Das humane HLA-DR verschwand wie auch bei sygener Transplantation nach Bestrahlung von der Oberfläche aller Zellen der überlebenden Mäuse. Bei den vorzeitig verstorbenen Tieren konnte kein HLA-DR-Wert im Verlauf bestimmt werden. War ein Wert ermittelbar,

deutete dieser, anders als beim humanen CD4 Molekül, auf das Verschwinden des Oberflächenproteins hin. Antigenpräsentierende Zellen, auf denen HLA-DR exprimiert wird (z.B. B-Zellen), werden also nicht so stark mobilisiert, bzw. haben eine kürzere Lebensdauer als (human) CD4⁺ tragende T-Zellen.

Bei allogener Transplantation kann anhand des Spender-MHC H2K^d das Anwachsen der übertragenen Zellen beurteilt werden. Am Tag -2 (vor dem Eingriff) war kein H2K^d auf den Zellen der Empfängertiere nachweisbar. Bei den frühzeitig verstorbenen Tieren waren keine Werte über 50% (TX-Exp 3) H2K^d auf den Lymphozyten der Mäuse messbar. Die überlebenden Tiere wiesen am Tag 19 nach Transplantation bereits einen Donor-Zell-Chimärismus von über 50% auf. Diese Messungen zeigten, dass Tiere, bei denen die Spenderzellen nicht anwuchsen, verstarben.

Im dreifach transgenen Mausmodell dient das murine CD4-Molekül ebenfalls der Bestimmung von Spenderzellen im Empfänger. Es zeigte sich ein vergleichbares Bild zum H2K^d. Lediglich die Tiere, bei denen murines CD4 nachweisbar war, überlebten bis zum Versuchsende.

Aufgrund der großen Bedeutung zytotoxischer T-Zellen bei Stammzelltransplantationen (GvHD, Abstoßungsreaktionen) wurde nach allogener Transplantation auf den Zellen des peripheren Blutes das CD8-Molekül bestimmt. CD8⁺ zytotoxische T-Zellen sind einerseits für den gewünschten GvT-Effekt wichtig (BARRETT 2008), andererseits spielen sie bei der Pathophysiologie der GvHD eine wesentliche Rolle (BALL und EGELER 2008). Hierbei war bei den überlebenden Tieren der allogenen Transplantationsexperimente ein vergleichbarer Verlauf zur syngenesischen Transplantation zu beobachten. Bei allen vorzeitig verstorbenen, allogenen transplantierten Mäusen stieg der Anteil CD8⁺ T-Zellen am Tag 19 auf 30 - 60% nach Transplantation. Dieser zunächst sehr steil erscheinende Anstieg relativiert sich jedoch, wenn man bedenkt, dass zu diesem Zeitpunkt (Tag 19) die Leukozytenwerte ihren Initialwert noch nicht wieder erreicht hatten. Trotzdem deutet dieser CD8-Peak auf ein zytotoxisches Geschehen hin. Die CD8⁺ T-Zellen der frühzeitig verstorbenen Tiere exprimierten kein H2K^d, d.h. es handelte sich um empfängereigene Zellen. Diese haben die Spenderzellen als fremd erkannt und zur Abstoßungsreaktion geführt, so dass ein Anwachsen der transplantierten Zellen und eine Rekonstitution der Hämatopoese verhindert wurden.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kotransplantation regulatorischer T-Zellen im syngenesischen Modell die Rekonstitution der Hämatopoese in den hier verwendeten humanisierten dreifach transgenen Mäusen erleichtert. Die zugrundeliegenden Mechanismen

für das beschleunigte Anwachsen der Spenderzellen sind für die zukünftige Forschung von höchstem Interesse. Das syngene Transplantationsmodell entspricht klinisch einer autologen Transplantation. Hierbei werden dem Patienten nach Bestrahlung oder Chemotherapie seine eigenen Stammzellen reinfundiert. Könnte man durch den Zusatz von T_{regs} zum autologen Transplantat die Zeit der Immunsuppression verkürzen, wäre das Risiko für gefährliche Sekundärinfektionen (Mykosen, Septikämien) deutlich vermindert.

Bei der gewählten Kombination an Mausstämmen als Spender- und Empfängertiere ist für die allogene Transplantation eine hohe Anzahl an Zellen im Transplantat notwendig, um das Anwachsen der Zellen und somit eine „neue“ Blutbildung zu erreichen. Die Kotransplantation von spendereigenen $CD4^+CD25^+$ T-Zellen behindert, anders als im syngen Modell, das Anwachsen der Spenderzellen im TTG-Empfänger. Hier gilt es zunächst zu untersuchen, ob die beschriebenen Effekte spezifisch für die gewählten Mausstämme sind. Verhindert die Kotransplantation von T_{regs} auch in anderen allogenen Modellen das Anwachsen des Transplantats, sollte der dafür verantwortliche Mechanismus geklärt werden. Durch die Kotransplantation regulatorischer T-Zellen könnten sich neue Indikationen für die Durchführung allogener Transplantationen (z.B. bei Autoimmunerkrankungen oder Allergien) in der Klinik ergeben.

6 Zusammenfassung

Katherina Rothe

Einfluss $CD4^+CD25^+$ regulatorischer T-Zellen auf die hämatopoetische Rekonstitution nach syngener und allogener Stammzelltransplantation in einem dreifach transgenen Mausmodell

Institut für Immunologie, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig, angefertigt im Fraunhofer Institut für Zelltherapie und Immunologie, Leipzig

Eingereicht im Oktober 2010

82 Seiten, 38 Abbildungen, 2 Tabellen, 142 Literaturangaben

Schlüsselwörter: $CD4^+CD25^+$ T-Zellen, Transplantation, syngen, allogen, dreifach transgen

Regulatorische $CD4^+CD25^+$ T-Zellen (T_{regs}) stellen eine kleine Zellpopulation dar (1-5% der peripheren Blutzellen), die hauptsächlich für die Regulierung von Immunreaktionen verantwortlich ist. In der vorliegenden Arbeit wurden diese Zellen gemeinsam mit Stammzellen syngen und allogen kotransplantiert, um ihren Effekt auf das Anwachsen der Spenderzellen und die Rekonstitution der Hämatopoese nach Ganzkörperbestrahlung zu untersuchen. Es wurden humanisierte dreifach transgene Empfängermäuse (C57Bl/6-TTG) verwendet (human $CD4^+$, murin $CD4^-$, human HLA-DR⁺), wodurch sowohl bei syngener als auch bei allogener Transplantation eine Unterscheidung zwischen Spender- und Empfängerzellen möglich ist. Zunächst wurden $CD4^+CD25^+$ T-Zellen durch Separation aus Milzzellen bzw. Buffy Coats gewonnen und *in vitro* mittels Durchflusszytometrie und ELISpot charakterisiert. Anschließend fanden syngene und allogene Transplantationen mit einer Laufzeit von 61 Tagen statt. Überleben und Gewicht wurden täglich ermittelt und außerdem wurden wöchentlich Blutbilder erstellt und durchflusszytometrische Chimärismusanalysen (murines und humanes CD4, CD8, MHC (H2D^b, H2K^d)) durchgeführt. Durch die magnetische Separation konnte die FoxP3-Expression der murinen Zellen (Transplantat) von 1,6% in der Ausgangspopulation auf 68,5% in der $CD4^+CD25^+$ Population gesteigert werden. In den ELISpot-Assays zeigten diese separierten Zellen, wie für T_{regs} typisch, keine Produktion von Interleukin-2.

Nach syngener Transplantation (Spender: wildtyp C57Bl/6) von 2×10^6 Knochenmarkzellen und 1×10^6 $CD4^+CD25^+$ T-Zellen überlebten 100% der Tiere, wie zu erwarten war. Dabei

setzte bei T_{regs} -kotrtransplantierten Tieren die Blutbildung nach bestrahlungsbedingter Leukozytopenie aufgrund bisher nicht bekannter Mechanismen früher wieder ein und der Donor-Zell-Chimärismus war an Tag 19 nach Transplantation signifikant höher als in der Kontrollgruppe. Dies zeigt, dass regulatorische T-Zellen im syngenem Transplantationsmodell einen positiven Effekt auf die Akzeptanz bzw. das Anwachsen des Transplantats haben. Dieses Modell entspricht klinisch einer autologen Transplantation. Nach einer knochenmarkzerstörenden Therapie werden dem Patienten eigene Stammzellen reinfundiert, um die Blutbildung und das Immunsystem wieder in Gang zu bringen. Der Zusatz von regulatorischen T-Zellen zum autologen Stammzelltransplantat könnte das Anwachsen der Zellen beschleunigen und die gefährliche Phase der Immunsuppression, in der es häufig zu Sekundärinfektionen kommt, verkürzen.

Die Transplantation der gleichen Zahl von allogenen Spenderzellen (wildtyp Balb/c) führte überraschend zum Tod aller dreifach transgenen Empfängertiere. Der Vergleich zu Experimenten mit wildtyp C57Bl/6-Empfängertieren zeigte, dass dreifach transgene Mäuse sehr viel höhere Zellzahlen im Transplantat zum Überleben benötigen (Daten nicht gezeigt). Das Ausbleiben der Blutbildung nach der Bestrahlung führte zu vermindertem Allgemeinbefinden, gestörter Futter- und Wasseraufnahme und Exsikkose bis zum Tod bzw. aus Tierschutzgründen zur Euthanasie. Durch Erhöhung der Zellzahl im Transplantat auf 1×10^7 Knochenmark + 5×10^6 Milzzellen überlebten 25% der Mäuse, bei 3×10^7 Knochenmark + 5×10^6 Milzzellen waren es 50%. Anders als im syngenem Modell führte die Kotransplantation $1,5 \times 10^6$ allogener $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zu 3×10^7 Knochenmark + 5×10^6 Milzzellen zum Versterben der Tiere. Dies verdeutlicht, dass regulatorische T-Zellen in diesem allogenen Transplantationsmodell das Anwachsen des Transplantats behindern (Transplantatversagen). Hier gilt es zu klären, ob dieser Effekt spezifisch für die gewählten Mausstämme ist und welche Mechanismen für das Transplantatversagen verantwortlich sind. In einem dreifach transgenem Mausmodell konnte ein positiver Effekt von regulatorischen T-Zellen auf die Rekonstitution der Hämatopoese bei syngener Kotransplantation nachgewiesen werden. Im allogenen Transplantationsmodell hingegen führte die Kotransplantation $CD4^+CD25^+$ T-Zellen zum Versterben der Empfänger. Der beschriebene und schon publizierte positive Effekt spenderspezifischer T_{regs} zur Behandlung von Graft versus Host Disease nach allogener Stammzelltransplantation widerspricht diesen Ergebnissen nicht, da es bei diesen Patienten schon zum Engraftment von hämatopoetischen Stammzellen gekommen ist. Dies hat weitreichende Konsequenzen für die therapeutische Anwendung regulatorischer T-Zellen bei hämatologischen Erkrankungen in der Human- und Veterinärmedizin.

7 Summary

Katherina Rothe

Influence of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells on hematopoietic recovery after syngeneic and allogeneic stem cell transplantation in a triple transgenic mouse model

Institute for Immunology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig, carried out in the Fraunhofer Institute for Cell Therapy and Immunology, Leipzig

Submitted in October 2010

82 pages, 38 figures, 2 tables, 142 references

Keywords: CD4⁺CD25⁺ T cells, transplantation, syngeneic, allogeneic, triple transgenic

Regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells (T_{regs}) represent a small cell population (1-5% of peripheral blood cells) mainly responsible for the regulation of the immune system. In the present work, these cells were cotransplanted with syngeneic and allogeneic stem cells in order to analyze the effect of T_{regs} on the reconstitution of hematopoiesis after total body irradiation. Humanized triple transgenic hosts (C57Bl/6-TTG) (human CD4⁺, murine CD4⁻, human HLA-DR⁺) were applied allowing differentiation of donor and host cells in syngeneic and allogeneic transplantation settings. Murine and human CD4⁺CD25⁺ T cells were magnetically separated out of splenocytes or buffy-coats and characterized *in vitro* by means of flow cytometry and ELISpot. Afterwards syngeneic and allogeneic transplantation experiments were performed for a period of 61 days. Survival and weight were assessed daily and once a week blood parameters and chimerism analyses (murine and human CD4, CD8, MHC (H2D^b/H2K^d)) were carried out.

FoxP3 expression increased from 1,6% in the initial murine cell fraction to 68,5% in the separated CD4⁺CD25⁺ T cells. ELISpot assays showed the typical lack of interleukin 2 production of T_{regs}.

After syngeneic transplantation (donor: wildtype C57Bl/6) of 2x10⁶ bone marrow cells and 1x10⁶ CD4⁺CD25⁺ T cells, 100% of mice survived what was to be expected. Cotransplanted animals showed earlier reconstitution of hematopoiesis after leukocytopenia and significant higher donor-cell-chimerism on day 19 after transplantation. The mechanisms for this positive effect of T_{regs} in syngeneic transplantation on the engraftment have to be investigated. This

model clinically correspond an autologous transplantation where patients are treated with their own stem cells after a myeloablative treatment (chemotherapy or irradiation). The addition of regulatory T cells to the transplant could accelerate the engraftment and shorten the risky period of immunosuppression.

Injection of the same numbers of allogeneic cells (donor: wildtype Balb/c) did not preserve hosts from mortality. Compared to experiments with wildtype recipients, results showed that triple transgenic mice need much higher cell numbers in the transplant for survival (data not shown). The failure of hematopoiesis after irradiation led to reduced general condition, disordered ingestion and exsikkosis leading to death respectively to euthanasia for reasons of protection of animals. By scaling up the cell number in the inoculum to 1×10^7 bone marrow cells + 5×10^6 splenocytes 25% of mice survived, with 3×10^7 bone marrow cells + 5×10^6 splenocytes survival was 50%. In contrast to syngeneic experiments, cotransplantation of $1,5 \times 10^6$ allogeneic $CD4^+CD25^+$ T cells and 3×10^7 bone marrow cells + 5×10^6 splenocytes did not prevent animals from mortality. In this allogeneic transplantation model T_{regs} restrain engraftment (graft failure). It has to be clarified if this effect is specific for the utilized mouse strains and which mechanisms are responsible for the graft failure.

In the syngeneic triple transgenic mouse model cotransplantation of $CD4^+CD25^+$ T cells showed a positive effect on reconstitution of hematopoiesis after irradiation. In the allogeneic setting however cotransplantation of allogeneic regulatory T cells avoided the engraftment of transplanted cells. The described and published effect of donor-specific T_{regs} for treatment of graft versus host disease after allogeneic transplantation does not contradict the presented results because treated patients already possessed engrafted hematopoietic stem cells. The results have wide consequences for the therapeutic appliance of regulatory T cells in hematological diseases in human and veterinary medicine.

8 Literaturverzeichnis

Akdis M. Immune tolerance in allergy. *Curr Opin Immunol* 2009 Dec;21(6):700-7.

Allen KJ, Mifsud NA, Williamson R, Bertolino P, Hardikar W. Cell-mediated rejection results in allograft loss after liver cell transplantation. *Liver Transpl* 2008 May;14(5):688-94.

Anasetti C, Hansen JA. Marrow transplantation in cancer therapy. *Tohoku J Exp Med* 1992 Oct;168(2):333-43.

Anon. Nierentransplantation in USA: Spendertiere müssen adoptiert werden. *VETimpulse* 2007 Nov;Nr.22, 16. Jahrgang:8.

Arancibia SA, Beltran CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, et al. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 2007;40(2):97-112.

Arnold B, Schonrich G, Hammerling GJ. Multiple levels of peripheral tolerance. *Immunol Today* 1993 Jan;14(1):12-4.

Ball LM, Egeler RM. Acute GvHD: pathogenesis and classification. *Bone Marrow Transplant* 2008 Jun;41 Suppl 2:S58-S64.

Baron U, Floess S, Wieczorek G, Baumann K, Grutzkau A, Dong J, et al. DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells. *Eur J Immunol* 2007 Sep;37(9):2378-89.

Barrett AJ. Understanding and harnessing the graft-versus-leukaemia effect. *Br J Haematol* 2008 Sep;142(6):877-88.

Barton-Burke M, Dwinell DM, Kafkas L, Lavalley C, Sands H, Proctor C, et al. Graft-versus-host disease: a complex long-term side effect of hematopoietic stem cell transplant. *Oncology (Williston Park)* 2008 Oct;22(11 Suppl Nurse Ed):31-45.

Berger M, Biasin E, Saglio F, Fagioli F. Innovative approaches to treat steroid-resistant or steroid refractory GVHD. *Bone Marrow Transplant* 2008 Oct;42 Suppl 2:S101-S105.

Bluestone JA, Abbas AK. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat Rev Immunol* 2003 Mar;3(3):253-7.

Bonilla FA, Oettgen HC. Adaptive immunity. J Allergy Clin Immunol 2010; 125(2 Suppl 2):S33-S40.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4+. J Exp Med 2003 Dec 15;198(12):1875-86.

Chen ZM, O'Shaughnessy MJ, Gramaglia I, Panoskaltsis-Mortari A, Murphy WJ, Narula S, et al. IL-10 and TGF-beta induce alloreactive CD4+. Blood 2003 Jun 15;101(12):5076-83.

Cheng MH, Shum AK, Anderson MS. What's new in the Aire? Trends Immunol 2007; 28(7):321-327.

Clark R, Kupper T. Old meets new: the interaction between innate and adaptive immunity. J Invest Dermatol 2005 Oct;125(4):629-37.

Clarke MF. Self-renewal and solid-tumor stem cells. Biol Blood Marrow Transplant 2005 Feb;11(2 Suppl 2):14-6.

Cohen JL, Salomon BL. Therapeutic potential of CD4+ CD25+ regulatory T cells in allogeneic transplantation. Cytotherapy 2005;7(2):166-70.

Cook R, Wu CC, Kang YJ, Han J. The role of the p38 pathway in adaptive immunity. Cell Mol Immunol 2007 Aug;4(4):253-9.

Cooke KR, Kobzik L, Martin TR, Brewer J, Delmonte J, Jr., Crawford JM, et al. An experimental model of idiopathic pneumonia syndrome after bone marrow transplantation: I. The roles of minor H antigens and endotoxin. Blood 1996 Oct 15;88(8):3230-9.

Cornell LD, Smith RN, Colvin RB. Kidney transplantation: mechanisms of rejection and acceptance. Annu Rev Pathol 2008;3:189-220.

Dazzi F, Fozza C. Disease relapse after haematopoietic stem cell transplantation: risk factors and treatment. Best Pract Res Clin Haematol 2007 Jun;20(2):311-27.

Deutsche Stiftung Organtransplantation (DSO). 2009 (zitiert vom 08.02.2010).
<http://www.dso.de/>

Deutsches Register für Stammzelltransplantationen (DRST). 2008 (zitiert vom 08.02.2010).
<http://www.drst.de/download/jb2008.pdf>.

Di IM, Del PB, Cecchini D, Bonifacio E, Moretti L, Zei T, et al. Immunomagnetic isolation of CD4+CD25+FoxP3+ natural T regulatory lymphocytes for clinical applications. Clin Exp Immunol 2009 May;156(2):246-53.

Dieckmann D, Plottner H, Berchtold S, Berger T, Schuler G. Ex vivo isolation and characterization of CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties from human blood. J Exp Med 2001 Jun 4;193(11):1303-10.

Duran-Struuck R, Dysko RC. Principles of bone marrow transplantation (BMT): providing optimal veterinary and husbandry care to irradiated mice in BMT studies. J Am Assoc Lab Anim Sci 2009 Jan;48(1):11-22.

Edenharter GM. Einfluss von CpG-DNA auf die Verteilung von Zellen des Immunsystems. 2005 (zitiert vom 08.02.2010).

[http://deposit.d-nb.de/cgi-](http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=980280109&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=980280109.pdf)

[bin/dokserv?idn=980280109&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=980280109.pdf](http://deposit.d-nb.de/cgi-bin/dokserv?idn=980280109&dok_var=d1&dok_ext=pdf&filename=980280109.pdf).

Edinger M, Hoffmann P, Ermann J, Drago K, Fathman CG, Strober S, et al. CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. Nat Med 2003 Sep;9(9):1144-50.

Ermann J, Hoffmann P, Edinger M, Dutt S, Blankenberg FG, Higgins JP, et al. Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. Blood 2005 Mar 1;105(5):2220-6.

Farber DL. Control of adaptive immunity: from naive to memory. J Pediatr Gastroenterol Nutr 2005 Apr;40 Suppl 1:S17-S19.

Feng G, Wood KJ, Bushell A. Interferon-gamma conditioning ex vivo generates CD25+CD62L+Foxp3+ regulatory T cells that prevent allograft rejection: potential avenues for cellular therapy. Transplantation 2008 Aug 27;86(4):578-89.

Ferrara JL. Advances in the clinical management of GVHD. Best Pract Res Clin Haematol 2008 Dec;21(4):677-82.

Ferrara JL, Cooke KR, Pan L, Krenger W. The immunopathophysiology of acute graft-versus-host-disease. Stem Cells 1996 Sep;14(5):473-89.

Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989; 170(6):2081-2095.

Floess S, Freyer J, Siewert C, Baron U, Olek S, Polansky J, et al. Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells. *PLoS Biol* 2007 Feb;5(2):e38.

Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003 Apr;4(4):330-6.

Fricke S, Ackermann M, Stolzing A, Schimmelpfennig C, Hilger N, Jahns J, et al. Allogeneic non-adherent bone marrow cells facilitate hematopoietic recovery but do not lead to allogeneic engraftment. *PLoS One* 2009;4(7):e6157.

Fuhrer M, Burdach S, Ebell W, Gadner H, Haas R, Harbott J, et al. Relapse and clonal disease in children with aplastic anemia (AA) after immunosuppressive therapy (IST): the SAA 94 experience. German/Austrian Pediatric Aplastic Anemia Working Group. *Klin Padiatr* 1998 Jul;210(4):173-9.

Gardner JM, Fletcher AL, Anderson MS, Turley SJ. AIRE in the thymus and beyond. *Curr Opin Immunol* 2009; 21(6):582-589.

Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liebhaver SA. Suppressor T cells. *J Immunol* 1972 Mar;108(3):586-90.

Gleißner Ch. Immunbremse gegen Abstoßung des fremden Herzens. 2004 (zitiert vom 08.02.2010).

<http://www.uni-heidelberg.de/presse/news04/2407immu.html>.

Golovina TN, Mikheeva T, Suhoski MM, Aqui NA, Tai VC, Shan X, et al. CD28 costimulation is essential for human T regulatory expansion and function. *J Immunol* 2008 Aug 15;181(4):2855-68.

Golshayan D, Jiang S, Tsang J, Garin MI, Mottet C, Lechler RI. In vitro-expanded donor alloantigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells promote experimental transplantation tolerance. *Blood* 2007 Jan 15;109(2):827-35.

Hartigan-O'Connor DJ, Poon C, Sinclair E, McCune JM. Human CD4⁺ regulatory T cells express lower levels of the IL-7 receptor alpha chain (CD127), allowing consistent identification and sorting of live cells. *J Immunol Methods* 2007 Jan 30;319(1-2):41-52.

Hasegawa H, Inoue A, Kohno M, Lei J, Miyazaki T, Yoshie O, et al. Therapeutic effect of CXCR3-expressing regulatory T cells on liver, lung and intestinal damages in a murine acute GVHD model. *Gene Ther* 2008 Feb;15(3):171-82.

Heinzel FP, Sadick MD, Holaday BJ, Coffman RL, Locksley RM. Reciprocal expression of interferon gamma or interleukin 4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J Exp Med* 1989; 169(1):59-72.

Hertel F. (zitiert vom 08.02.2010).

http://www.wilmnet.de/schule/krpflegschule/dateien/dateien/allogene_stammzellentransplantation_frank_hertel.pdf.

Ho VT, Cutler C. Current and novel therapies in acute GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Jun;21(2):223-37.

Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Albrecht J, Doser K, Piseshka B, et al. Isolation of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells for clinical trials. *Biol Blood Marrow Transplant* 2006a Mar;12(3):267-74.

Hoffmann P, Boeld TJ, Eder R, Huehn J, Floess S, Wieczorek G, et al. Loss of FOXP3 expression in natural human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells upon repetitive in vitro stimulation. *Eur J Immunol* 2009 Apr;39(4):1088-97.

Hoffmann P, Eder R, Boeld TJ, Doser K, Piseshka B, Andreessen R, et al. Only the CD45RA⁺ subpopulation of CD4⁺CD25^{high} T cells gives rise to homogeneous regulatory T-cell lines upon in vitro expansion. *Blood* 2006b Dec 15;108(13):4260-7.

Hoffmann P, Eder R, Kunz-Schughart LA, Andreessen R, Edinger M. Large-scale in vitro expansion of polyclonal human CD4⁽⁺⁾CD25^{high} regulatory T cells. *Blood* 2004 Aug 1;104(3):895-903.

Hoffmann P, Ermann J, Edinger M. CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in hematopoietic stem cell transplantation. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;293:265-85.

Hoffmann P, Ermann J, Edinger M, Fathman CG, Strober S. Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation. *J Exp Med* 2002 Aug 5;196(3):389-99.

Hogquist KA, Baldwin TA, Jameson SC. Central tolerance: learning self-control in the thymus. *Nat Rev Immunol* 2005 Oct;5(10):772-82.

Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003 Feb 14;299(5609):1057-61.

Huang CT, Workman CJ, Flies D, Pan X, Marson AL, Zhou G, et al. Role of LAG-3 in regulatory T cells. *Immunity* 2004 Oct;21(4):503-13.

Huber S, Schramm C, Lehr HA, Mann A, Schmitt S, Becker C, et al. Cutting edge: TGF-beta signaling is required for the in vivo expansion and immunosuppressive capacity of regulatory CD4+CD25+ T cells. *J Immunol* 2004 Dec 1;173(11):6526-31.

Iwasaki A, Medzhitov R. Regulation of adaptive immunity by the innate immune system. *Science* 2010 Jan 15;327(5963):291-5.

Janeway CA, Jr. T-cell development: a role for self-peptides in positive selection. *Curr Biol* 1999 May 6;9(9):R342-R345.

Janeway CA, Jr., Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.

Joffre O, Gorsse N, Romagnoli P, Hudrisier D, van Meerwijk JP. Induction of antigen-specific tolerance to bone marrow allografts with CD4+CD25+ T lymphocytes. *Blood* 2004 Jun 1;103(11):4216-21.

Jones SC, Murphy GF, Korngold R. Post-hematopoietic cell transplantation control of graft-versus-host disease by donor CD425 T cells to allow an effective graft-versus-leukemia response. *Biol Blood Marrow Transplant* 2003 Apr;9(4):243-56.

Kabelitz. Angeborene Immunität: Entzündung, Komplementsystem, NK-Zellen. (zitiert vom 08.02.2010).

http://www.uk-sh.de/media/custom/1595_565_3.PDF.

Karim M, Bushell AR, Wood KJ. Regulatory T cells in transplantation. *Curr Opin Immunol* 2002 Oct;14(5):584-91.

Kasprowicz DJ, Smallwood PS, Tyznik AJ, Ziegler SF. Scurfin (FoxP3) controls T-dependent immune responses in vivo through regulation of CD4+ T cell effector function. *J Immunol* 2003 Aug 1;171(3):1216-23.

Klein L, Hinterberger M, Wirnsberger G, Kyewski B. Antigen presentation in the thymus for positive selection and central tolerance induction. *Nat Rev Immunol* 2009 Dec;9(12):833-44.

Korczak-Kowalska G, Wierzbicki P, Bocian K, Klosowska D, Niemczyk M, Wyzgal J, et al. The influence of immuosuppressive therapy on the development of CD4+CD25+ T cells after renal transplantation. *Transplant Proc* 2007 Nov;39(9):2721-3.

Kornacker M, Stumm J, Pott C, Dietrich S, Sussmilch S, Hensel M, et al. Characteristics of relapse after autologous stem-cell transplantation for follicular lymphoma: a long-term follow-up. *Ann Oncol* 2009 Apr;20(4):722-8.

Lai YH, Chang CS, Liu YC, Liu TC. Postallogeneic hematopoietic stem cell transplantation relapse of acute myeloid leukemia presenting with salivary gland myelosarcoma. *Ann Hematol* 2010; 89(6):631-633.

Laub R, Brecht R, Dorsch M, Valey U, Wenk K, Emmrich F. Anti-human CD4 induces peripheral tolerance in a human CD4+, murine CD4-, HLA-DR+ advanced transgenic mouse model. *J Immunol* 2002 Sep 15;169(6):2947-55.

Laub R, Dorsch M, Meyer D, Ermann J, Hedrich HJ, Emmrich F. A multiple transgenic mouse model with a partially humanized activation pathway for helper T cell responses. *J Immunol Methods* 2000 Dec 1;246(1-2):37-50.

Le BS, Geha RS. IPEX and the role of Foxp3 in the development and function of human Tregs. *J Clin Invest* 2006 Jun;116(6):1473-5.

Lee JW, Joachim DH. Prevention of chronic GVHD. *Best Pract Res Clin Haematol* 2008 Jun;21(2):259-70.

Levings MK, Bacchetta R, Schulz U, Roncarolo MG. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2002 Dec;129(4):263-76.

Lin T, Jones RJ, Matsui W. Cancer stem cells: relevance to SCT. Bone Marrow Transplant 2009 Apr;43(7):517-23.

Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, et al. CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. J Exp Med 2006 Jul 10;203(7):1701-11.

Malek TR, Yu A, Vincek V, Scibelli P, Kong L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. Immunity 2002 Aug;17(2):167-78.

Mathis D, Benoist C. A decade of AIRE. Nat Rev Immunol 2007; 7(8):645-650.

Matsumoto M. The role of autoimmune regulator (Aire) in the development of the immune system. Microbes Infect 2009; 11(12):928-934.

McHugh RS, Shevach EM, Thornton AM. Control of organ-specific autoimmunity by immunoregulatory CD4(+)CD25(+) T cells. Microbes Infect 2001 Sep;3(11):919-27.

McHugh RS, Whitters MJ, Piccirillo CA, Young DA, Shevach EM, Collins M, et al. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. Immunity 2002 Feb;16(2):311-23.

Mills CD, Kincaid K, Alt JM, Heilman MJ, Hill AM. M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm. J Immunol 2000; 164(12):6166-6173.

Miltenyi S, Muller W, Weichel W, Radbruch A. High gradient magnetic cell separation with MACS. Cytometry 1990;11(2):231-8.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. 1986. J Immunol 2005; 175(1):5-14.

Mueller DL. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. Nat Immunol 2010 Jan;11(1):21-7.

Muller YD, Golshayan D, Ehrchiou D, Wekerle T, Seebach JD, Buhler LH. T regulatory cells in xenotransplantation. Xenotransplantation 2009 May;16(3):121-8.

Murphy KM, Travers P, Walport M. Janeway's Immunobiology. 7. Auflage ed. 2007.

NC State College of Veterinary Medicine Veterinary Teaching Hospital. Canine Bone Marrow Transplant. (zitiert vom 25.04.2010).

http://www.cvm.ncsu.edu/vth/clinical_services/onco/BoneMarrowTransplant.html

Nguyen VH, Zeiser R, Negrin RS. Role of naturally arising regulatory T cells in hematopoietic cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2006 Oct;12(10):995-1009.

Polansky JK, Kretschmer K, Freyer J, Floess S, Garbe A, Baron U, et al. DNA methylation controls Foxp3 gene expression. Eur J Immunol 2008 Jun;38(6):1654-63.

Pulaiev RA, Puliaeva IA, Ryan AE, Via CS. The Parent-into-F1 Model of Graft-vs-Host Disease as a Model of In Vivo T Cell Function and Immunomodulation. Curr Med Chem Immunol Endocr Metab Agents 2005 Dec 1;5(6):575-83.

Rappeport J, Mihm M, Reinherz E, Lopansri S, Parkman R. Acute graft-versus-host disease in recipients of bone-marrow transplants from identical twin donors. Lancet 1979 Oct 6;2(8145):717-20.

Read S, Malmstrom V, Powrie F. Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation. J Exp Med 2000 Jul 17;192(2):295-302.

Reddy P, Arora M, Guimond M, Mackall CL. GVHD: a continuing barrier to the safety of allogeneic transplantation. Biol Blood Marrow Transplant 2009 Jan;15(1 Suppl):162-8.

Redmond WL, Sherman LA. Peripheral tolerance of CD8 T lymphocytes. Immunity 2005 Mar;22(3):275-84.

Robertson M. Innate immunity. Curr Biol 1998 Aug 27;8(17):R595-R597.

Robinson DS, Larche M, Durham SR. Tregs and allergic disease. J Clin Invest 2004 Nov;114(10):1389-97.

Safdar A, Rodriguez GH, Mihiu CN, Mora-Ramos L, Mulanovich V, Chemaly RF et al. Infections in non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation patients with lymphoid malignancies: spectrum of infections, predictors of outcome and proposed guidelines for fungal infection prevention. Bone Marrow Transplant 2010; 45(2):339-347.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-62.

Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995 Aug 1;155(3):1151-64.

Schubert LA, Jeffery E, Zhang Y, Ramsdell F, Ziegler SF. Scurfin (FOXP3) acts as a repressor of transcription and regulates T cell activation. *J Biol Chem* 2001 Oct 5;276(40):37672-9.

Semple JW, Freedman J. Platelets and innate immunity. *Cell Mol Life Sci* 2010 Feb;67(4):499-511.

Setoguchi R, Hori S, Takahashi T, Sakaguchi S. Homeostatic maintenance of natural Foxp3(+) CD25(+) CD4(+) regulatory T cells by interleukin (IL)-2 and induction of autoimmune disease by IL-2 neutralization. *J Exp Med* 2005 Mar 7;201(5):723-35.

Shevach EM. CD4⁺ CD25⁺ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat Rev Immunol* 2002 Jun;2(6):389-400.

Shimizu J, Yamazaki S, Takahashi T, Ishida Y, Sakaguchi S. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat Immunol* 2002 Feb;3(2):135-42.

Sioud M. Does our current understanding of immune tolerance, autoimmunity, and immunosuppressive mechanisms facilitate the design of efficient cancer vaccines? *Scand J Immunol* 2009 Dec;70(6):516-25.

Smith M, Tourigny MR, Noakes P, Thornton CA, Tulic MK, Prescott SL. Children with egg allergy have evidence of reduced neonatal CD4(+)CD25(+)CD127(lo/-) regulatory T cell function. *J Allergy Clin Immunol* 2008 Jun;121(6):1460-6, 1466.

Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol* 2001 Apr;13(2):248-54.

Stelljes M, Strothotte R, Pauels HG, Poremba C, Milse M, Specht C, et al. Graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation induces a CD8+ T cell-mediated graft-versus-tumor effect that is independent of the recognition of alloantigenic tumor targets. *Blood* 2004 Aug 15;104(4):1210-6.

Su H, Ye DQ, Wang BL, Fang XH, Chen J, Wang Q, et al. Transforming growth factor-beta1-induced CD4+CD25+ regulatory T cells in vitro reverse and prevent a murine lupus-like syndrome of chronic graft-versus-host disease. *Br J Dermatol* 2008 Jun;158(6):1197-209.

Suzuki E, Kobayashi Y, Kawano O, Endo K, Haneda H, Yukiue H et al. Expression of AIRE in thymocytes and peripheral lymphocytes. *Autoimmunity* 2008; 41(2):133-139.

Taams LS, Smith J, Rustin MH, Salmon M, Poulter LW, Akbar AN. Human anergic/suppressive CD4(+)CD25(+) T cells: a highly differentiated and apoptosis-prone population. *Eur J Immunol* 2001 Apr;31(4):1122-31.

Takahashi T, Tagami T, Yamazaki S, Uede T, Shimizu J, Sakaguchi N, et al. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J Exp Med* 2000 Jul 17;192(2):303-10.

Taylor PA, Lees CJ, Blazar BR. The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 2002 May 15;99(10):3493-9.

Taylor PA, Noelle RJ, Blazar BR. CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells are required for induction of tolerance to alloantigen via costimulatory blockade. *J Exp Med* 2001 Jun 4;193(11):1311-8.

Thornton AM, Shevach EM. CD4+CD25+ immunoregulatory T cells suppress polyclonal T cell activation in vitro by inhibiting interleukin 2 production. *J Exp Med* 1998 Jul 20;188(2):287-96.

Tierärztliches Institut für angewandte Kleintiermedizin. Das maligne Lymphom des Hundes. 2007 (zitiert vom 25.04.2010).

http://www.kritische-tiermedizin.de/2007/Das_maligne_Lymphom_des_Hundes.html.

Tierschutzgesetz (TierSchG) vom 18. Mai 2006 (BGBl. I S. 1206, 1313), zuletzt geändert durch das Gesetz vom 15. Juli 2009 (BGBl. I S. 1950).

Toda A, Piccirillo CA. Development and function of naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Leukoc Biol* 2006 Sep;80(3):458-70.

Tomita Y, Sachs DH, Sykes M. Myelosuppressive conditioning is required to achieve engraftment of pluripotent stem cells contained in moderate doses of syngeneic bone marrow. *Blood* 1994 Feb 15;83(4):939-48.

Trenado A, Charlotte F, Fisson S, Yagello M, Klatzmann D, Salomon BL, et al. Recipient-type specific CD4+CD25+ regulatory T cells favor immune reconstitution and control graft-versus-host disease while maintaining graft-versus-leukemia. *J Clin Invest* 2003 Dec;112(11):1688-96.

Trzonkowski P, Szarynska M, Mysliwska J, Mysliwski A. Ex vivo expansion of CD4(+)CD25(+) T regulatory cells for immunosuppressive therapy. *Cytometry A* 2009; 75(3):175-188.

Tsuboi I, Morimoto K, Sakuma A, Horie T, Sakoda H, Mori KJ. In vivo effect of a large amount of allogeneic granulocytes on reconstitution of hemopoietic cells of irradiated mice. *Leuk Res* 1991;15(10):921-6.

Tuthill M, Chen F, Paston S, De La PH, Rusakiewicz S, Madrigal A. The prevention and treatment of cytomegalovirus infection in haematopoietic stem cell transplantation. *Cancer Immunol Immunother* 2009 Sep;58(9):1481-8.

Uber WE, Self SE, Van Bakel AB, Pereira NL. Acute antibody-mediated rejection following heart transplantation. *Am J Transplant* 2007 Sep;7(9):2064-74.

Velásquez-Lopera MM, Eaton VL, Lerret NM, Correa LA, DeCresce RP, García LF, et al. Induction of transplantation tolerance by allogeneic donor-derived CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells. *Transplant Immunology* 2008 May;19(2):127-35.

Wahl SM, Orenstein JM, Chen W. TGF-beta influences the life and death decisions of T lymphocytes. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000 Mar;11(1-2):71-9

Walsh PT, Taylor DK, Turka LA. Tregs and transplantation tolerance. *J Clin Invest* 2004 Nov;114(10):1398-403.

Wing K, Onishi Y, Prieto-Martin P, Yamaguchi T, Miyara M, Fehervari Z, et al. CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* 2008 Oct 10;322(5899):271-5.

Wolff SN. Second hematopoietic stem cell transplantation for the treatment of graft failure, graft rejection or relapse after allogeneic transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2002 Apr;29(7):545-52.

Yamagiwa S, Gray JD, Hashimoto S, Horwitz DA. A role for TGF-beta in the generation and expansion of CD4+CD25+ regulatory T cells from human peripheral blood. *J Immunol* 2001 Jun 15;166(12):7282-9.

Yang J, Gao L, Liu Y, Ren Y, Xie R, Fan H et al. Adoptive therapy by transfusing expanded donor murine natural killer T cells can suppress acute graft-versus-host disease in allogeneic bone marrow transplantation. *Transfusion* 2010; 50(2):407-417.

Zarek PE, Huang CT, Lutz ER, Kowalski J, Horton MR, Linden J, et al. A2A receptor signaling promotes peripheral tolerance by inducing T-cell anergy and the generation of adaptive regulatory T cells. *Blood* 2008 Jan 1;111(1):251-9.

Zeng D, Hoffmann P, Lan F, Huie P, Higgins J, Strober S. Unique patterns of surface receptors, cytokine secretion, and immune functions distinguish T cells in the bone marrow from those in the periphery: impact on allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 2002 Feb 15;99(4):1449-57.

Zhang ZL, Tong J, Lu RN, Scutt AM, Goltzman D, Miao DS. Therapeutic potential of non-adherent BM-derived mesenchymal stem cells in tissue regeneration. *Bone Marrow Transplant* 2009 Jan;43(1):69-81.

Zheng SG, Wang JH, Gray JD, Soucier H, Horwitz DA. Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. *J Immunol* 2004 May 1;172(9):5213-21.

Zheng Y, Rudensky AY. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat Immunol* 2007 May;8(5):457-62.

Ziegler SF. FOXP3: of mice and men. *Annu Rev Immunol* 2006;24:209-26.

Zou L, Barnett B, Safah H, Larussa VF, Evdemon-Hogan M, Mottram P et al. Bone marrow is a reservoir for CD4+CD25+ regulatory T cells that traffic through CXCL12/CXCR4 signals. *Cancer Res* 2004; 64(22):8451-8455.

9 Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Gottfried Alber für die unkomplizierte Betreuung und die gute Beratung während des Dissertationsvorhabens bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. Stephan Fricke für die Bereitstellung des Themas, und für die Korrektur des Manuskriptes.

Herrn Prof. Dr. med. Frank Emmrich und Herrn Prof. Dr. med. Ulrich Sack danke ich für die Realisierbarkeit der Promotion am Fraunhofer IZI und die Möglichkeit der Nutzung der Räumlichkeiten des Instituts für Klinische Immunologie der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig.

Der gesamten Arbeitsgruppe bestehend aus Frau Dipl. Biol. Nadja Hilger, Frau Dr. Ellen Svanidze, Frau MTA Stephanie Tuche und Herrn cand. med. Daniel Uhlemann möchte ich ganz besonders für die tolle Zusammenarbeit, die freundliche Arbeitsatmosphäre, den herzlichen Umgang und den regen Gedankenaustausch danken. Ohne eure Unterstützung wäre diese Arbeit nicht möglich gewesen!

Bei Frau Dr. rer. nat. Manja Kamprad und Frau Dipl. Biol. Manuela Ackermann möchte ich mich für die Einarbeitung in die Welt der Durchflusszytometrie und für die stetigen Bemühungen, für jedes FACS-Anliegen eine gute Lösung zu finden, bedanken.

Für die akribisch angefertigten Schnitte und kunstvoll ausgeführten Färbungen der Mäusebeine danke ich Frau MTA Ramona Blaschke.

Frau Dr. med. Jutta Jahns danke ich für die Durchführung der Bestrahlung der Versuchstiere und Frau Dr. med. vet. Petra Madaj-Sterba und Frau Dipl. vet. Ing. Hannelore Scholz für die Betreuung der Tiere im Medizinisch Experimentellen Zentrum.

Für die stets guten Ratschläge und die Hilfsbereitschaft bezüglich der T_{regs}-Separationen möchte ich Herrn Dr. rer. nat. Christoph Vess danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern, Julia und Marco, Michael und meinen Freunden sagen: Danke für die liebevolle Unterstützung und die vielen offenen Ohren, die ihr mir während meiner Promotionszeit geliehen habt.